

**Membrandiffusion
und Resorption homologer Salze
anticholinergisch wirkender quartärer
Ammoniumverbindungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Wolfgang Lettenbauer
aus Nördlingen

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533922_0009

Membrandiffusion, und Resorption homologer Salze
anticholinergisch wirkender quartärer Ammonium-
verbindungen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Wolfgang Lettenbauer
aus Nördlingen

1979



1. Berichterstatter: Professor Dr. B.C. Lippold

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Greef

Tag der mündlichen Prüfung: 4.7.1979

Die vorliegende Arbeit wurde in der pharmazeutisch-technologischen Abteilung des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München sowie am Institut für Pharmazeutische Technologie der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Meinem hochverehrten akademischen Lehrer,

Herrn Professor Dr. Bernhard C. Lippold

unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand, danke ich herzlich für die vielfältige Förderung und jederzeit großzügig gewährte Unterstützung meiner Untersuchungen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. H.J. Bieniek für die freundliche Unterstützung bei der Inanspruchnahme der Tierversuchsanlage für die pharmakokinetischen Untersuchungen.

Membrandiffusion und Resorption homologer Salze
anticholinergisch wirkender quartärer Ammonium-
verbindungen

Seite

Inhaltsverzeichnis

I.	EINFÜHRUNG	1
II.	PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER ARZNEISTOFFE	3
1.	Arzneistoffübersicht	3
2.	Physikalisch-chemische Eigenschaften	4
2.1	Homologe Benzilsäurecholinesterbromide	4
2.2	Homologe Salze des Tridihexethyls	4
2.2.1	Schmelzpunkte und Löslichkeiten	4
2.2.2	Oberflächenspannungen	8
2.2.3	Ionenpaardissoziationskonstanten in Wasser	10
3.	Verteilungskoeffizienten zwischen n-Octanol und Wasser	13
4.	Relative Diffusionswerte in n-Octanol	19
III.	MEMBRANDIFFUSION	22
1.	Allgemeines	22
2.	Membrandiffusion homologer Benzilsäurecholin- esterbromide	24
3.	Membrandiffusion homologer Tridihexethylsalze	29
4.	Membranbindung	36
5.	Zusammenfassung von Gesetzmäßigkeiten der Membrandiffusion	41

IV.	UNTERSUCHUNGEN ZUR RESORPTION VON SALZEN	
	DES TRIDIHEXETHYLS	42
1.	Allgemeines	42
2.	Akute Toxizität nach intraperitonealer Injektion an der Maus	43
3.	Spasmolytische Wirkung am isolierten Jejunum der Ratte	49
4.	Ausscheidung nach peroraler Applikation an der Maus	54
5.	Pharmakokinetik von Tridihexethylethyl- und decylsulfonat nach intravenöser und peroraler Applikation am Hund	58
5.1	Allgemeines	58
5.2	Festlegung des biologischen Modells, Unter- suchung der Elimination	62
5.3	Modifizierung des Zweikompartimentmodells bei peroraler Applikation	67
5.3.1	Verringerte Bioverfügbarkeit	67
5.3.2	Unterschiedliches Resorptionsverhalten der Salze unter der Annahme einer Bindung an die Mucosa	68
5.3.3	Unterschiedliches Resorptionsverhalten der Salze unter der Annahme eines "first pass"- Effektes	78
5.3.4	Vergleich der Modelle mit Arzneistoffbindung und "first pass" - Effekt	85
6.	Zusammenfassung von Gesetzmäßigkeiten der Resorption	85

V. EXPERIMENTELLER TEIL UND AUSWERTUNGEN	88
1. Herstellung der Tridihexethylsalze	88
2. Schmelzpunkte und Löslichkeiten	89
3. Oberflächenspannung	90
4. Dissoziationskonstanten	90
5. Verteilungskoeffizienten	91
6. Relative Diffusionswerte	92
7. Membrandiffusion	93
7.1 Vorbereitung der Membranen	93
7.2 Durchführung der Diffusionsversuche	93
7.3 Ermittlung der Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten $k_{I,II}$	95
7.3.1 Bestimmung unter Gleichgewichtsbedingungen	95
7.3.2 Bestimmung unter "sink"-Bedingungen	97
7.4 Membranbindung	99
8. Bestimmung der akuten Toxizität an der Maus	101
9. Untersuchungen der spasmolytischen Wirkung am isolierten Jejunum der Ratte	102
10. Ausscheidung nach peroraler Applikation an der Maus, Ionenpaarextraktion	107
10.1 Versuchsdurchführung	107
10.2 Ionenpaarextraktion	107
11. Pharmakokinetische Untersuchungen am Hund, Hochdruckflüssigkeitschromatographie	110
11.1 Versuchsdurchführung	110
11.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographische Analytik von Tridihexethylsalzen	112

	Seite
11.2.1 Verfahren	112
11.2.2 Bestimmung in Plasma	117
11.2.3 Bestimmung in Urin	118
11.3 Auswertung der Meßergebnisse durch Abschälen	121
11.4 Ermittlung der Mikrokonstanten am Analogrechner	127
VI. ZUSAMMENFASSUNG	131
VII. LITERATUR	135

I. EINFÜHRUNG

Die Bioverfügbarkeit⁺ quartärer Ammoniumverbindungen gilt allgemein als gering (14, 59a, 63, 84, 120). So konnten verschiedene Autoren nachweisen, daß bei diesen Arzneistoffen zwischen intravenöser und peroraler Applikation oft große Unterschiede in den resorbierten bzw. mit dem Urin ausgeschiedenen Mengen gefunden werden (62, 66, 120). Als Grund für die geringe Resorption aus dem Gastro-Intestinaltrakt ist primär die Hydrophilie der quartären Arzneistoffe anzunehmen (59a).

Eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit nach peroraler Applikation sollte dann möglich sein, wenn es gelingt, die Lipophilie der Verbindungen zu vergrößern. Eine entsprechende Maßnahme stellt die Verlängerung von Alkylketten am Arzneistoffkation dar (23). Hierdurch wird jedoch nicht nur eine Änderung des Resorptionsvorganges, sondern auch der übrigen pharmakokinetischen Abläufe sowie der pharmakodynamischen Wirkungen hervorgerufen (23).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu ermitteln, ob sich durch pharmazeutisch-technologische Maßnahmen, nämlich durch Einsatz lipophiler Gegenionen, die Resorption hydrophiler quartärer Ammoniumverbindungen verbessern läßt.

⁺ Bioverfügbarkeit bezeichnet die Geschwindigkeit und das Ausmaß, womit der therapeutisch wirksame Anteil eines Arzneimittels resorbiert und am Wirkort verfügbar wird (26).

Die dabei zu Grunde liegende Hypothese geht von der Vorstellung aus, daß dissoziierte Verbindungen in Form von Ionenpaaren resorbiert werden (48). Bisherige Untersuchungen in dieser Richtung sind allerdings widersprüchlich. So finden sich sowohl Hinweise für eine Verbesserung (14, 28, 30, 44, 52, 55, 96, 111, 122) als auch für eine Verschlechterung (66, 82) der Resorption durch lipophile Gegenionen.

Als Modells substanz kommt das äußerst hydrophile Tridihexethylchlorid ⁺ zur Anwendung. Nach Abklärung der physikalisch-chemischen Eigenschaften homologer Salze dieser quartären Arzneisubstanz wird eine Simulierung der gastrointestinalen Resorption an einem Membranmodell durchgeführt. Als Vergleich dienen homologe Benzilsäurecholinesterbromide mit unterschiedlich langen Alkylketten am quartären Zentrum.

Die hierbei gewonnenen Ergebnisse sind hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf In-vivo-Verhältnisse zu überprüfen. Hierzu erfolgen Untersuchungen zu Toxizität nach intraperitonealer Applikation, zur spasmolytischen Wirkung am isolierten Organ sowie zur Pharmakokinetik nach intravenöser und peroraler Applikation.

⁺ (3-Cyclohexyl-3-hydroxy-3-phenylpropyl)-triethylammoniumchlorid

II. PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER ARZNEISTOFFE

1. Arzneistoffübersicht

Homologe Benzilsäurecholinesterbromide

Die N-(2-Benziloyloxyethyl)-N,N-dimethyl-N-alkylammoniumbromide (Abb. 1) (C_5 , C_6 , C_8 - C_{12} - Homologe) werden ohne Vorbehandlung, das C_7 - Homologe nach Umkristallisation aus Methanol zu den Versuchen verwendet (Hersteller: Boehringer, Ingelheim).

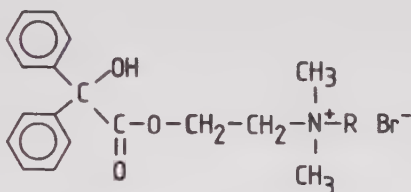


Abb. 1

Homologe Salze des Tridihexethyls

Aus (3-Cyclohexyl-3-hydroxy-3-phenylpropyl)-triethylammoniumchlorid (=Tridihexethylchlorid, Abb. 2) (Hersteller: Cyanamid-Lederle, München) werden mittels Ionenpaarextraktion (siehe exptl. Teil) homologe Salze von n-Alkylsulfonaten, n-Alkylsulfaten und n-Alkylcarboxylaten sowie von o-Benzoesäuresulfimid⁺ und Metamizol⁺⁺ hergestellt (Tab. 1).

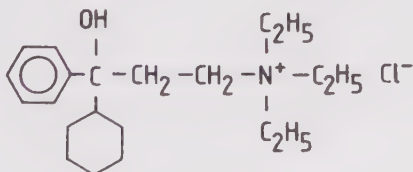


Abb. 2

⁺ DAB8 : Saccharin

⁺⁺ = DAB8 - Bezeichnung für Phenyl-dimethyl-pyrazolon-methyl-amino-methansulfonat

2. Physikalisch-chemische Eigenschaften

2.1 Homologe Benzilsäurecholinesterbromide

Schmelzpunkte, Sättigungskonzentrationen, Oberflächenaktivität, n-Octanol-Wasserverteilungskoeffizienten sind bereits beschrieben (72)⁺.

2.2 Homologe Salze des Tridihexethyls

2.2.1 Schmelzpunkte und Löslichkeiten

Die Schmelzpunkte der hergestellten organischen Salze liegen niedriger als der des Chlorids⁺ und nehmen innerhalb der homologen Reihen mit Ausnahme des Ethylhomologen der n-Alkylsulfonate mit Zunahme der Kettenlänge ab (Tab. 1, Abb. 3). Die Schmelzpunkte der Tridihexethyl-n-alkylsulfonate und -n-alkylsulfate zeigen damit im Vergleich zu den homologen Benzilsäurecholinestern abweichendes Verhalten (72). Bei diesen fallen die Schmelzpunkte vom Methyl- bis zum Butylderivat stark ab, steigen dann aber bei einer Alkylkette von 5 Kohlenstoffatomen mit jeder neuen CH₂ - Einheit wieder regelmäßig an. Bei homologen Benzilonium-n-alkylsulfonaten (76) ist allerdings ebenfalls eine mit Zunahme der Kettenlänge einhergehende kontinuierliche Schmelzpunktabnahme zu verzeichnen. Die Unterschiede in den Schmelzpunkten der Homologen dürften durch eine mit Veränderung der Kettenlänge einhergehende Abwandlung der kristallinen Struktur bedingt sein: Bei den Anfangsgliedern der homologen Reihen spielt die polare Basisgruppe eine dominierende Rolle - die Schmelzpunkte sind entsprechend hoch. Der am Anfang unre-

⁺ Den Firmen Cyanamid-Lederle und Boehringer, Ingelheim danken wir für die Überlassung der Substanzen.

gelmäßige Verlauf geht wohl auf anfängliche Koordinations-
schwierigkeiten zwischen Basisgruppe und kleinem Alkylrest
zurück (9). Die Länge der unregelmäßigen Periode hängt
auch von der Größe der Basisgruppe ab. Da erst bei längeren
Alkylen die Kristallbildungsfähigkeit der Paraffine zu wir-
ken beginnt (9), ist auch bei den Tridihexethylsalzen bei
weiterer Kettenverlängerung ein Anstieg der Schmelzpunkte
analog dem der Benzilsäurecholinester (72) zu erwarten.

Tab. 1 : Tridihexethylsalze: Ausbeuten, Molekulargewichte, Schmelzpunkte sowie Sättigungslöslichkeiten in Wasser und n-Octanol

Anion	Ausb.(%)	Mol.Gew.	FP (o _C)	Sättig. konz.in Wasser (Mol/l)	Sättig. konz.in n-Octanol (Mol/l)
Cl ⁻	-	353,97	198	-	-
C ₂ H ₅ SO ₃ ⁻	12	427,6	114	-	7,6 x 10 ⁻⁴
C ₄ H ₉ SO ₃ ⁻	65	455,7	125	0,36	4,25x 10 ⁻³
C ₆ H ₁₃ SO ₃ ⁻	83	483,8	118	0,19	3,7 x 10 ⁻²
C ₈ H ₁₇ SO ₃ ⁻	88	511,8	110	2,5 x 10 ⁻²	9,2 x 10 ⁻²
C ₁₀ H ₂₁ SO ₃ ⁻	87	539,9	102	1,6 x 10 ⁻²	5,4 x 10 ⁻²
C ₁₂ H ₂₅ SO ₃ ⁻	72	567,9	91	1,7 x 10 ⁻³	8,6 x 10 ⁻²
C ₄ H ₉ OSO ₃ ⁻	84	471,5	134	0,69	7,6 x 10 ⁻³
C ₈ H ₁₇ OSO ₃ ⁻	79	527,6	116	9,6 x 10 ⁻³	6,9 x 10 ⁻²
C ₁₀ H ₂₁ OSO ₃ ⁻	91	554,6	104	1,9 x 10 ⁻³	7,9 x 10 ⁻²
C ₃ H ₇ COO ⁻	23	405,6	+	-	-
C ₅ H ₁₁ COO ⁻	28	433,7	+	-	-
C ₇ H ₁₅ COO ⁻	45	461,7	71	-	3,5 x 10 ⁻²
C ₉ H ₁₉ COO ⁻	59	489,8	43	-	6,6 x 10 ⁻²
C ₁₃ H ₁₆ N ₃ SO ₄ ⁻	71	628,8	+	-	-
C ₇ H ₄ NO ₃ S ⁻	52	500,7	165	-	-

+ konnte nicht kristallin erhalten werden

Das Lösungsverhalten der homologen Salze des Tridihexethyls ist allerdings mit dem der Benzilsäurecholinester vergleichbar: Die Löslichkeit in Wasser ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) verringert sich mit Zunahme der Kettenlänge der Gegenionen innerhalb einer homologen Reihe, während die in n-Octanol zunimmt. Schmelzpunkte und Lösungsverhalten werden durch die Gitterenergie der Kristalle beeinflusst (9, 72, 130). Die bei beiden Verbindungstypen feststellbare abnehmende Löslichkeit in Wasser mit abnehmender Kettenlänge ist durch die zunehmend hydrophoben Eigenschaften der Alkylreste bedingt. Umgekehrt dazu nimmt die Löslichkeit in n-Octanol infolge abnehmender Gitterenergie und dem zunehmend hydrophoben Charakter zu.

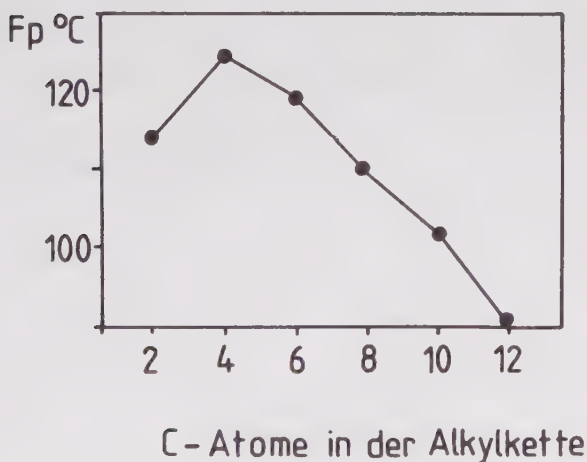


Abb. 3 : Schmelzpunkte der homologen Tridihexethyl-n-alkylsulfonate in Abhängigkeit von der Zahl der Kohlenstoffatome in der Alkylkette

2.2.2 Oberflächenspannungen

Mit steigender Zahl der CH_2 - Gruppen der Homologen sinkt die Oberflächenspannung von Lösungen homologer Tridihexethyl-n-Alkylsulfonate, n-Alkylsulfate und -n-Alkylcarboxylate unter den gewählten Bedingungen ($1,0 \cdot 10^{-3}$ Mol/l) in typischer Weise ab (72) (Abb. 4). Die mit steigender Zahl der CH_2 - Gruppen anfangs schwache und später stärkere Herabsetzung der Oberflächenspannung ist charakteristisch für homologe, amphiphile Substanzen. Vergrößerung des lipophilen Anteils führt zu verstärkter Anreicherung an der Grenzfläche, welche sowohl von der Kettenlänge als auch von der Konzentration der Homologen abhängig ist. Die in Abb. 4 bei den Hexylderivaten beginnende Erniedrigung der Oberflächenspannung ist daher uncharakteristisch, da diese je nach Konzentration bei höheren oder niedrigeren Homologen auftreten kann (12, 72, 110). Vielmehr gilt, daß entsprechend der Traube'schen Regel pro zusätzliche CH_2 -Gruppe jeweils nur etwa ein Drittel der Konzentration des vorangegangenen Homologen zur gleichen Oberflächenspannung benötigt wird (110). Mizellbildung ist bei den untersuchten Tridihexethylsalzen nicht nachzuweisen, wie Messungen der Oberflächenspannung des Tridihexethyldodecylsulfonats in wäßriger Lösung bis zur Sättigung zeigen (Konzentration: $2,5 \cdot 10^{-4}$ bis $1,7 \cdot 10^{-3}$ Mol/l; Oberflächenspannung: 41,2 bis $31,3 \cdot 10^{-5}$ N/cm).

Na-dodecylsulfonat hingegen besitzt eine CMC von $9,8 \cdot 10^{-3}$ Mol/l (20°C), Na-decylsulfat eine von $3,3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l (25°C) (87).

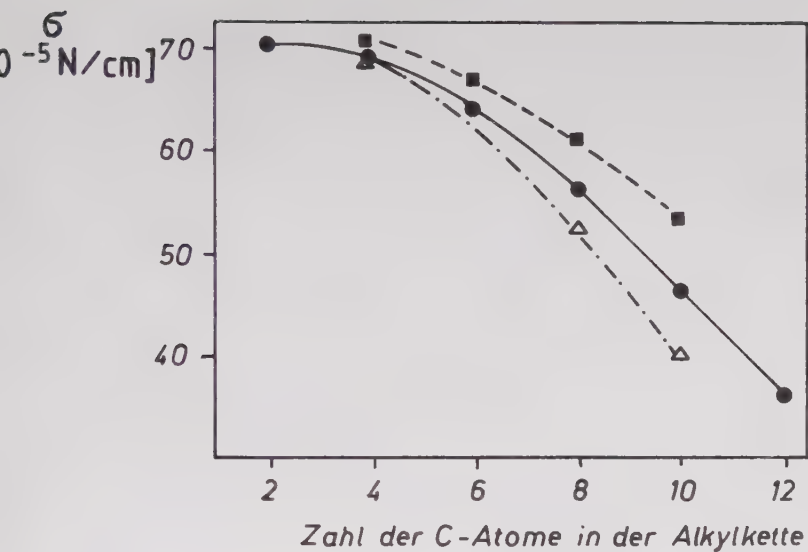


Abb. 4 : Oberflächenspannung (σ) wäßriger Lösungen der homologen Tridihexethylsalze in Abhängigkeit von der Zahl der C-Atome in der Alkylkette (Temp. $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$; $c = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$)

- Tridihexethyl-n-alkylsulfonate
- △ Tridihexethyl-n-alkylsulfate
- Tridihexethyl-n-alkylcarboxylate

2.2.3 Ionenpaardissoziationskonstanten in Wasser

Die Tridihexethyl-n-alkylsulfonate und -alkylsulfate dissoziieren in Wasser stark (pK-Werte der Ionenpaardissoziation zwischen 1,4 und 1,8, Tab. 2). Die Dissoziation der Salze in wassergesättigtem n-Octanol ist dagegen gering, wie Untersuchungen mit dem Tridihexethyldodecylsulfonat ergeben (pK der Ionenpaardissoziation: 4,8) und entspricht damit Literaturangaben für ähnliche Verbindungen (71, 72).

Tab. 2 : pK-Werte der Ionenpaardissoziation homologer Tridihexethyl-n-alkylsulfonate und -sulfate in Wasser
(Temp.: $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Konzentration $2 \cdot 10^{-3}$ bis $1,25 \cdot 10^{-4}$ Mol/l)

Zahl der C-Atome in der Alkylkette	n-Alkylsulfonate					n-Alkylsulfate		
	C ₄	C ₆	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₄	C ₈	C ₁₀
pK-Werte	1,44	1,60	1,68	1,71	1,84	1,57	1,72	1,79

Mit zunehmender Kettenlänge der Anionen steigen die pK-Werte der Ionenpaardissoziation in Wasser an, die Assoziationstendenz vergrößert sich (Tab. 2). Bei gleicher Alkylkettenlänge unterscheiden sich die Tridihexethyl-n-alkylsulfonate und -alkylsulfate nur geringfügig in ihren Dissoziationskonstanten, was auf gleichartige Hydratation der verschiedenen Anionen schließen läßt. Unter der Annahme einer etwa gleichartigen Hydratation der

Sulfonat anionen innerhalb einer homologen Reihe erscheint es berechtigt, die unterschiedlichen pK-Werte der Ionenpaar-dissoziation mit den induktiven Effekten der einzelnen Alkylgruppen in einen Zusammenhang zu bringen (71).

Dementsprechend sind in Abb. 5 die pK-Werte der Ionenpaar-dissoziation für die homologen Tridihexethylsulfonate in Wasser gegen die entsprechenden Substituentenkonstanten nach Taft (σ^*) (123, 128) aufgetragen. Der annähernd geradlinige Verlauf zeigt, daß Unterschiede der freien Reaktionsenthalpien der Dissoziation bzw. der Ionenpaartrennungsenergien entsprechend Gl. 1 in erster Linie auf die verschieden starken, positiven induktiven Effekte der Substituenten zurückzuführen sind (71):

$$pK - pK_u = \sigma^* \cdot \rho^* \quad (Gl. 1)$$

Dabei ist pK_u der pK-Wert der entsprechenden Methylverbindung der Alkylhomologen. Die Reaktionskonstante ρ^* , ein Maß für die Beeinflussbarkeit des Dissoziationsgleichgewichts durch induktive Effekte, beträgt -6,5.

Die Tendenz zunehmender Ionenpaardissoziation bei steigender Kettenlänge der Anionen läßt sich auch für homologe Phenylalkylammoniumsulfonate in n-Octanol nachweisen (71). Bei Konkurrenz von Ladungsdichte und Solvation kann auch bei Halogenidanionen mit Zunahme der Radien erhöhte Assoziation in verschiedenen Alkoholen beobachtet werden (24, 25, 57, 58, 71). Im Gegensatz dazu nimmt die Assoziation homologer Benzilsäure-

cholinesterbromide in n-Octanol bei wachsender Kettenlänge ab, da sich hierbei durch den positiven induktiven Effekt der Alkylkette die Ladungsdichte am quartären Stickstoff verringert (72).

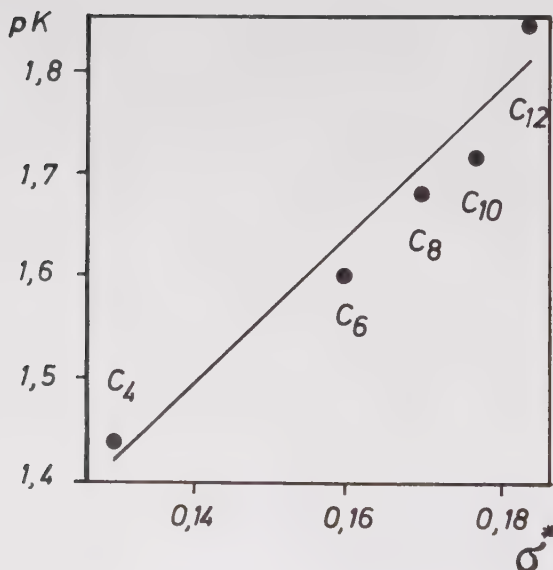


Abb. 5 : pK-Werte der Ionenpaardissoziation homologer Tridihexethyl-n-alkylsulfonate in Wasser in Abhängigkeit von den Substituentenkonstanten nach Taft (σ^*)
(Temp.: 20[±]0,1°C)

3. Verteilungskoeffizienten zwischen n-Octanol und Wasser

Die Pharmakokinetik eines Arzneimittels wird wesentlich von seiner Passage durch Lipidmembranen und vom Ausmaß seiner Verteilung in Lipidgeweben bestimmt. Hierbei ist die Größe des Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizienten von entscheidender Bedeutung (11, 46, 49, 104). Zur Simulierung körpereigener Lipide wird häufig n-Octanol verwendet (53, 60, 69, 70, 132), da es auf Grund seiner geringfügigen Wasseraufnahme und der polaren alkoholischen OH-Gruppe physiologischen Verhältnissen nahe kommt (60). Als Grundlage für Untersuchungen der Membrandiffusion und der Resorption homologer quartärer Ammoniumverbindungen dient daher ihr Verteilungsverhalten.

Der experimentelle Verteilungskoeffizient homologer Salze (S)⁺ ergibt sich aus dem Verhältnis der Konzentration des Arzneistoffs in der organischen Phase (c_{org}) und in der wäßrigen Phase (c_w) (69, 72, 74):

$$S = \frac{c_{org}}{c_w} \quad (Gl. 2)$$

Die experimentellen Verteilungskoeffizienten S der Tridihexethylalkylsulfonate, -sulfate und -carboxylate steigen mit zunehmender Kettenlänge an (Tab. 3). In Abb. 6 sind entsprechend Gleichung 3 (Gleichung nach Hansch) (47) die Logarithmen der experimentel-

⁺ S ist eine experimentelle Größe und auf Grund der konzentrationsabhängigen Dissoziation der Salze ebenfalls konzentrationsabhängig.

len Verteilungskoeffizienten S der homologen Salze gegen die Zahl n der Kohlenstoffatome in der Alkylkette aufgetragen; es ergeben sich Geraden.

Tab. 3 : Experimentelle Verteilungskoeffizienten S der Tridihexethylsalze zwischen n -Octanol und Wasser sowie S_0 - und π_S -Werte
(Temp.: $20 \pm 1^\circ\text{C}$; Anfangskonzentration $c_{I_0} = 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$)

Zahl der C-Atome in Alkylkette	R-SO_3^-	R-O-SO_3^-	R-COO^-
2	0,011	-	-
4	0,055	0,024	0,081
6	0,14	-	0,31
8	2,0	1,8	1,3
10	9,7	8,9	5,0
12	32	-	-
S_0	$1,8 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-3}$
π_S	0,36	0,42	0,30

⁺ Unter Einbeziehung der Carboxylgruppe bei den Carboxylaten

$$\log S_n = \pi_S \cdot n + \log S_0 \quad (\text{Gl. 3})$$

Dabei ist S_n der experimentelle Verteilungskoeffizient des n -ten homologen Salzes, S_0 der des hypothetischen Anfangsgliedes, π_S die Steigung der Geraden (Abb. 6, Tab. 3). Die bei den jeweiligen homologen Reihen ermittelten Hansch-Konstanten π_S sind von ähnlicher Größenordnung wie die vergleichbarer Verbindungen (46, 73, 76, 99).

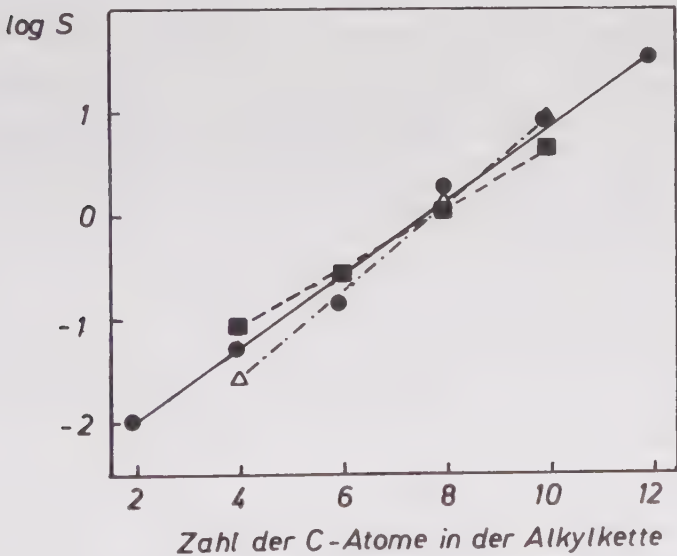


Abb. 6 : Logarithmen der experimentellen Verteilungskoeffizienten S homologer Tridihexethylsalze in Abhängigkeit von der Zahl der C-Atome in der Alkylkette
(Temp.: $20^{\pm 1} \text{ } ^\circ\text{C}$; Anfangskonzentration $c_{\text{I}0} = 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$)

- Tridihexethyl-n-alkylsulfonate
- △ Tridihexethyl-n-alkylsulfate
- Tridihexethyl-n-alkylcarboxylate

Unterschiede in den π_S - Werten weisen darauf hin, daß bei der Verteilung zwischen organischer und wäßriger Phase die Änderung der freien Enthalpie pro CH_2 - Gruppe durch die Art des Anions beeinflußt wird (38, 73).

Die Hansch-Konstante homologer Benzilsäurecholinesterbromide ($\pi_S = 0,43$) zeigt, daß Kettenverlängerung am Kation wie auch am Anion vergleichbaren Einfluß auf das Verteilungsverhalten quartärer Ammoniumverbindungen hat (Hansch-Konstanten der homologen Tridihexethylsalze $\pi_S = 0,30$ bis $0,42$). Für homologe Benzilonium-n-alkylsulfonate konnten entsprechende Befunde ($\pi_S = 0,44$) nachgewiesen werden (76).

Die bei den homologen Salzen auftretende logarithmische Zunahme der Verteilungskoeffizienten mit wachsender Kettenlänge der Alkylgruppe ist charakteristisch für undissoziierte Verbindungen wie auch für solche, die in der organischen Phase Ionenpaare bilden (32, 60). Abweichungen vom geradlinigen Verlauf sind nicht zu erwarten, da der Verteilungskoeffizient von der freien Energie des Phasenübertritts der gelösten Moleküle und damit nicht von der Kristallstruktur abhängig ist (32, 60, 72, 76, 130). Die Antilogarithmen der Hansch-Konstanten liefern die entsprechenden Gruppenkonstanten F_S der Methylengruppe (32, 45, 51, 60, 132). Mit ihrer Hilfe lassen sich die Änderungen der freien Enthalpie des Phasenübertritts $\Delta(\Delta G)$ pro Methylengruppe berechnen (18, 73):

$$\Delta(\Delta G)_x = - RT \cdot \ln F_x \quad (\text{Gl. 4})$$

hierbei ist $\Delta(\Delta G)_x$ der Zuwachs an freier Energie für den Über-

tritt einer funktionellen Gruppe x aus der wäßrigen in die organische Phase, R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur, F_x die entsprechende Gruppenkonstante.

Die aus den experimentellen Verteilungskoeffizienten S resultierenden Gruppenkonstanten F_S sind auf Grund der gleichzeitigen Verteilung von Ionen und Ionenpaaren zusammengesetzte, nicht thermodynamische Konstanten. Die daraus resultierenden Änderungen der freien Enthalpie sind charakteristisch für den gewählten Konzentrationsbereich und liegen zwischen -1683 J/Mol und -2356 J/Mol. Damit ergeben sie etwa die Hälfte der in der Literatur angegebenen Werte (18). Diese Abweichung ist darauf zurückzuführen, daß die Gegenionenkonzentration in der wäßrigen Phase bei der Ermittlung des experimentellen Verteilungskoeffizienten S nicht berücksichtigt wird (73). Unter Verwendung des experimentellen Extraktionskoeffizienten $E^x + (69, 72)$, der die Gegenionenkonzentration mit einbezieht, resultieren Gruppenkonstanten F_{Ex} bzw. lassen sich Änderungen der freien Enthalpie des Phasenübertritts $\Delta(\Delta G)$ pro Methylengruppe errechnen

* Der experimentelle Extraktionskoeffizient (E^x) wird unter Berücksichtigung der Gegenionkonzentration in der wäßrigen Phase ermittelt (69, 72, 85). Unter Annahme der Abwesenheit von Fremdelektrolyten und weitgehender Assoziation in der organischen Phase gilt:

$$c_{\text{Kation}} \cdot c_{\text{Anion}} = c_w^2 \quad \text{und}$$

$$E^x = \frac{c_{\text{org}}}{c_w^2}$$

(73), deren Werte mit denen der Literatur für undissoziierte Verbindungen (18) vergleichbar sind (errechnete freie Enthalpien der Tridihexethylsalze $\Delta(\Delta G)$: -2356, -3201 sowie -3478 J/Mol pro CH_2 - Gruppe).

Zusätzlich wurden die Verteilungskoeffizienten S anderer Tridihexethylsalze untersucht:

S von Tridihexethylchlorid:	$1,6 \cdot 10^{-3}$
S von Tridihexethylchlorid (mit 0,1N NaCl):	$4,9 \cdot 10^{-3}$
S vom Tridihexethylsalz des Metamizols:	2,7
S vom Tridihexethylsalz des o-Benzoesäuresulfimids:	0,11

(Anfangskonzentration $c_{\text{I}0}$ jeweils $2,0 \cdot 10^{-3}$ Mol/l)

4. Relative Diffusionswerte in n-Octanol

Mit Zunahme der Zahl der C-Atome in der Alkylkette bzw. mit Zunahme des Molekulargewichtes (MG) der Salze ist eine geringfügige Abnahme der relativen Diffusionswerte D_{rel}^+ der homologen Tridihexethyl-n-alkylsulfonate sowie der anderen untersuchten Tridihexethylsalze festzustellen. In Abb. 7 sind die relativen Diffusionswerte der Tridihexethylsalze in wassergesättigtem n-Octanol gegen die reziproken Werte der Wurzel aus den Molekulargewichten aufgetragen. Hierbei läßt sich ein linearer Zusammenhang nachweisen, dem in Anlehnung an Thovert (124) Gl. 5 zu Grunde liegt:

$$D_{rel} \cdot MG^{1/2} = \text{const.} \quad (\text{Gl. 5})$$

Es zeigt sich, daß das Tridihexethylchlorid auf Grund seines geringen Molekulargewichts bzw. Molekülradius einen wesentlich höheren relativen Diffusionswert aufweist als die homologen Alkylsulfonate. Dieser Befund ist bei einem Vergleich der Diffusionsgeschwindigkeiten unterschiedlicher Salze zu berücksichtigen (siehe III.3, Abb. 12). Entsprechendes gilt auch für das o-Benzoesäuresulfimidsalz mit einem D_{rel} von 0,046. Die für die genannten, in n-Octanol zu Ionenpaaren assoziierten Verbindungen gültige Beziehung nach Gl. 5 weist darauf hin, daß eine gleichartige Solvation im Lösungsmittel angenommen werden kann.

⁺ Der relative Diffusionswert errechnet sich als Quotient aus diffundierter und vorgelegter Substanzmenge nach 72 Stdn. Diffusionszeit (siehe exptl. Teil).

Lediglich das Metamizolsalz mit einem relativen Diffusionswert von 0,038 fügt sich nicht mehr ganz in die genannte Beziehung ein. Offensichtlich spielen hier Solvatationseffekte bereits eine stärkere Rolle.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß die Abhängigkeit der Diffusionskoeffizienten bzw. relativen Diffusionswerte von der reziproken Wurzel aus dem Molekulargewicht nicht nur für undissoziierte Verbindungen in Flüssigkeiten gültig ist (124), sondern auch für solche, die Ionenpaare bilden. Abweichungen sind nur dann zu erwarten, wenn unterschiedliche Solvatationseffekte eine größere Rolle spielen.

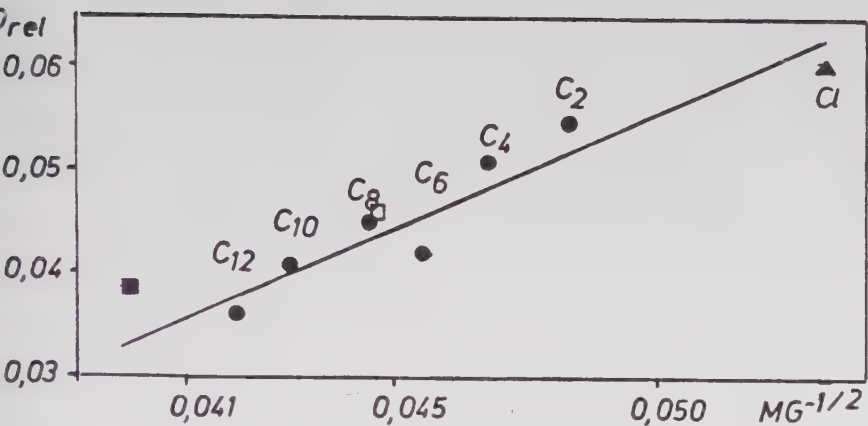


Abb. 7 : Relative Diffusionswerte D_{rel} von Tridihexethylsalzen in n-Octanol in Abhängigkeit von den reziproken Werten der Wurzel aus den Molekulargewichten

- Tridihexethyl-n-alkylsulfonate
- ▲ Tridihexethylchlorid
- Tridihexethylsalz des Metamizols
- Tridihexethylsalz des o-Benzoesäuresulfimids

III. MEMBRANDIFFUSION

1. Allgemeines

Ein wesentliches Kriterium für die Resorbierbarkeit peroral applizierter, gelöster Arzneistoffe ist deren Lipophilie, ausgedrückt als Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizient (11, 104). Entsprechende In-vivo-Untersuchungen ergeben neben linearen (46) allerdings auch parabolische Zusammenhänge (45, 67). Physikalisch-chemische Untersuchungen sollen helfen, diese Befunde zu deuten.

Darüber hinaus soll der Frage nachgegangen werden, welche Gesetzmäßigkeiten für den Transport dissoziierter Verbindungen durch Lipidmembranen bestehen. Deshalb kommen als Arzneistoffe quartäre Ammoniumverbindungen (homologe Benzilsäurecholinesterbromide und homologe Tridihexethylsalze) zum Einsatz.

Verschiedene In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen haben gezeigt, daß die Diffusion dissoziierter Arzneistoffe durch Membranen bis auf wenige Ausnahmen (10, 39) durch Gegenionen beeinflusst wird (14, 28, 30, 44, 52, 55, 66, 76, 90, 111, 122). Bisherige Arbeiten zur Verteilungskinetik homologer quartärer Benzilsäurecholinesterbromide (73) und Benzilonium-n-alkylsulfonate (76) in einem Dreikompartimentmodell nach Schulman (105) (Wasser/n-Octanol/Wasser) zeigen, daß die Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten der Homologen nur in bestimmten Bereichen in einem Zusammenhang mit ihrem Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizienten stehen. Diesen Befund ergeben auch Untersuchungen anderer Autoren für undissoziierte (34, 35, 51,

93, 129) und dissoziierte Verbindungen (115, 121).

Ungeklärt ist jedoch, ob die für die Verteilungskinetik abgeleiteten Gesetzmäßigkeiten auch für die Diffusion durch Lipidmembranen gültig sind (121). Zur Durchführung entsprechender Versuche wird das Sartorius-Resorptionsmodell (117, 118) herangezogen, bestehend aus 2 Kompartimenten (I und II) mit wäßriger Lösung und einer dazwischen geschalteten Membran. Als solche kommen mit n-Octanol getränkte poröse Zellulosenitratfilter zum Einsatz. Im Versuch wird die linke Kammer des Resorptionsmodells mit 100 ml Arzneistofflösung, die rechte Kammer mit 100 ml destilliertem Wasser gefüllt und der Arzneistofftransport durch die Membran gemessen. Dieser Arzneistoffübertritt kann durch die Übertrittsgeschwindigkeitskonstante $k_{I,II}$ ausgedrückt werden, für die unter "sink"-Bedingungen ⁺ die nachstehende einfache Beziehung gilt:

$$\log c_I = \log c_{I0} - k_{I,II} t / 2,303 \quad (Gl. 6)$$

Die für die obige Gleichung notwendige Einstellung eines quasistationären Zustands wird bei einer Membranbindung unter 10% erreicht. Bei einer größeren Membranbindung gelten andere Bedingungen (siehe exptl. Teil). Die Übertrittsgeschwindigkeitskonstante $k_{I,II}$ faßt den Diffusionskoeffizienten des

⁺ "sink"-Bedingungen sind vorhanden, wenn nicht mehr als 10% der Arzneistoffabnahme aus Kompartiment I bis zum Gleichgewicht erfolgt ist. Kompartiment II verhält sich in dieser Zeit als "sink".

Arzneistoffs D in der Membran, Fläche F und Schichtdicke d der Membran sowie den Verteilungskoeffizienten S zwischen Membran und Wasser mit dem Volumen V von Kompartiment I zusammen zu

$$k_{I,II} = \frac{D \cdot F \cdot S}{d \cdot V} \quad (\text{Gl. 7})$$

2. Membrandiffusion homologer quartärer Benzilsäurecholinesterbromide

Der Einfluß unterschiedlich lipophiler Eigenschaften des Arzneistoffkations auf die Membrandiffusion wird am Beispiel homologer Benzilsäurecholinesterbromide untersucht. In Abb.8 sind die Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten $k_{I,II}$ der Benzilsäurecholinesterbromide halblogarithmisch gegen die Zahl der Kohlenstoffatome in der Alkylkette aufgetragen. Es ergibt sich bis zum Nonylderivat eine Gerade mit der Steigung 0,24⁺. Mit weiterer Kettenverlängerung weichen die Logarithmen der $k_{I,II}$ - Werte vom linearen Verlauf ab und nähern sich einem Grenzwert von ca. $5,0 \cdot 10^{-1}$ (Std.⁻¹).

⁺ Die Steigung weicht von der der n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ab (log S gegen Zahl der C-Atome; (73)), entspricht aber der der Membranbindungskonstanten VK'_B (log VK'_B gegen Zahl der C-Atome; III,4).

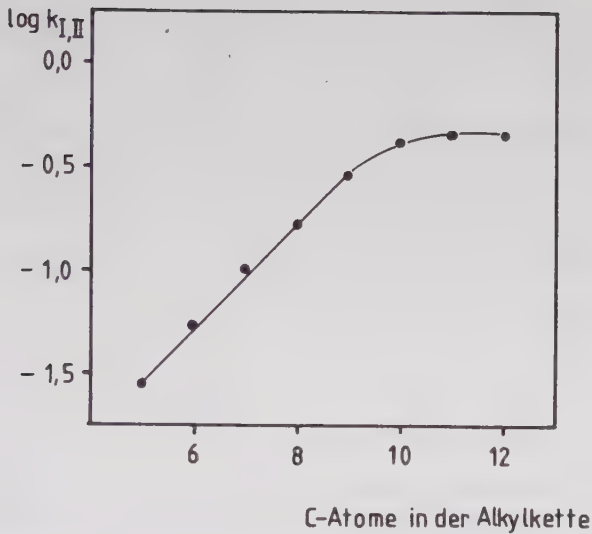


Abb.8 : Logarithmen der Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten $k_{I,II}$ homologer Benzilsäurecholinester in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Alkylrestes

Temp.: $36 \pm 1^\circ\text{C}$; Anfangskonzentration c_{I0} :
 $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$

Abb. 8 bestätigt die am Dreikompartimentmodell ermittelten Gesetzmäßigkeiten für die Arzneistoffdiffusion durch Lipidmembranen : Für die hydrophilen Homologen ist die Membrandiffusion der zu Ionenpaaren assoziierten Salze (73) geschwindigkeitsbestimmend. Die Übertrittsgeschwindigkeitskonstante $k_{I,II}$ ist dabei gleich dem Produkt aus der Geschwindigkeitskonstanten für die Diffusion in der Membran k_M und dem entsprechenden experimentellen Verteilungskoeffizienten der

Substanzen S zwischen Membran und Wasser (vgl. Gl.7):

$$k_{I,II} = k_M \cdot S \quad (\text{Gl. 8})$$

Mit Verlängerung der Alkylkette erhöhen sich die Logarithmen der experimentellen Verteilungskoeffizienten S linear und damit auch die Logarithmen der $k_{I,II}$ - Werte (Abb. 8). Die Diffusionsgeschwindigkeitskonstante k_M bleibt dabei von der Kettenverlängerung weitgehend unbeeinflusst und ist damit nicht verteilungskontrolliert. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß auf Grund der Flexibilität langer Alkylketten und der damit verbundenen Knäuelung (88) sich die Molekülradien und damit die Diffusionskoeffizienten mit Kettenverlängerung nur geringfügig verändern. Darauf weisen auch die geringen Unterschiede in den relativen Diffusionswerten vom Hexyl- bis zum Dodecylderivat der homologen Tridihexethyl-n-alkylsulfonate hin.

Bei weiterer Kettenverlängerung der Alkylkette und damit steigenden Werten für das Produkt $k_M \cdot S$ (Gl. 8) verlagert sich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in die wäßrigen, adhärierenden Schichten an der Membran (34, 51, 73, 114, 115): An den Berührungsflächen zwischen Membran und wäßriger Lösungen bestehen nichtbewegte, adhärierende Schichten (Abb. 9), durch die die Salze ebenfalls diffundieren. Damit lassen sich unter der Annahme, daß für die hydrophile Substanz die Diffusion durch die organische n-Octanolschicht, dagegen für stark lipophile Verbindungen die Diffusion durch die wäßrigen, adhäre-

renden Schichten geschwindigkeitsbestimmend ist, verschiedene Konzentrationsverläufe für den Stofftransport von Kompartiment I in Kompartiment II beschreiben. Im ersten Fall ist der Konzentrationsgradient in der wäßrigen, adhärierenden Schicht groß im Vergleich zu dem der organischen Schicht. Damit läuft die Diffusion in der wäßrigen adhärierenden Schicht im Vergleich zur organischen Schicht schnell ab und die Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten $k_{I,II}$ sind den entsprechenden Membran-Wasser-Verteilungskoeffizienten direkt proportional (Abb. 9a). Bei Kettenverlängerung wird jedoch der Konzentrationsgradient in der organischen Phase größer im Vergleich zu dem der wäßrigen, adhärierenden Schichten. Damit wird mit zunehmender Lipophilie der Substanz die Übertrittsgeschwindigkeitskonstante $k_{I,II}$ jedoch unabhängig vom experimentellen Verteilungskoeffizienten Membran/Wasser und entspricht der Geschwindigkeitskonstanten für die Diffusion durch die wäßrigen, adhärierenden Schichten k_W ($k_W \ll k_M \cdot S$) (Abb. 9b), so daß gilt:

$$k_{I,II} = k_W \quad (Gl. 9)$$

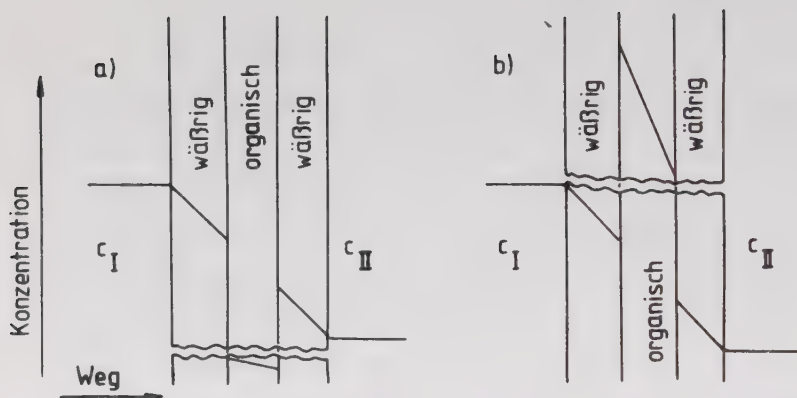


Abb. 9 : Konzentrationsgradienten in den wässrigen, adhärierenden Schichten und der Membran beim Übertritt einer hydrophilen (a) und einer lipophilen (b) Verbindung von Kompartiment I in Kompartiment II ($c_I > c_{II}$).

Allerdings müssen die nach dem vereinfachten Verfahren ermittelten Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten unter den Gesichtspunkten einer Membranbindung größer bzw. kleiner 10% diskutiert werden. Bis zum C₈-Derivat ist die Barrierenbindung kleiner 10% und bei der Bestimmung der $k_{I,II}$ - Werte zu vernachlässigen. Die so ermittelten Werte sind echte Geschwindigkeitskonstanten für die Membrandiffusion und die Arzneistoffabnahme in Phase I entspricht der Zunahme in Phase II. Für den Transport ist Diffusion durch das n-Octanol in den Poren der Stüttschicht anzunehmen. Bei einer Barrierenbindung größer 10% ist die Abnahme nicht mehr mit der Zunahme identisch.

Allerdings stellt die Barriere in diesem Fall selbst einen "sink" dar (51, 121), ähnlich wie die n-Octanolphase im Dreikompartimentmodell. Damit können die aus der Arzneistoffabnahme im Kompartiment I ermittelten Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten durchaus mit denen für den Übertritt aus Wasser in n-Octanol (73) bzw. mit denen beim Fehlen von Membranbindung ermittelten verglichen werden. Experimentelle Befunde anderer Autoren (79) bestätigen die anfänglichen "sink"-Eigenschaften von Membranen durch deren hohe Bindungskapazitäten für lipophile Arzneistoffe.

3. Membrandiffusion homologer Tridihexethylsalze

Die Abhängigkeit der Membrandiffusion eines Arzneistoffkations von der Lipophilie der Gegenionen wird am Beispiel homologer Alkylsulfonat-, Alkylsulfat- und Carboxylatsalze des Tridihexethyls untersucht. Zusätzlich werden auch andere Salze, die keiner homologen Reihe angehören, mit einbezogen (Chlorid-, o-Benzoesäuresulfimid- und Metamizolsalz).

In Abb. 10 sind die Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten $k_{I,II}$ für die Diffusion der verschiedenen homologen Salze durch ein mit n-Octanol getränktes Membranfilter halblogarithmisch gegen die Zahl der Kohlenstoffatome in der Alkylkette aufgetragen. Hierbei ergeben sich für die Anfangsglieder Geraden mit Steigungen von 0,25 (Alkylsulfonate) sowie 0,27 (Alkylsulfate) und

0,17 (Carboxylate) ⁺. Diese Abweichungen dürften wie im Falle der homologen Benzilsäurecholinesterbromide auf differierende Membranbindungskonstanten VK'_B zurückzuführen sein. Letztere sind allerdings wegen der geringen Aufnahme an Arzneistoff in die Membran nur im Fall der Decyl- und Dodecylhomologen der Tridihexethyl-alkylsulfonate zu bestimmen. Die aus diesen Werten errechnete Steigung entspricht der der Anfangsglieder der Geraden für die $\log k_{I,II}$ - Werte. Die Unterschiede der Steigungen zwischen den homologen Reihen sind mit denen aus den experimentellen n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten vergleichbar.

⁺ Sie liegen damit niedriger als die entsprechenden Steigungen bei der Auftragung der Logarithmen der Verteilungskoeffizienten gegen die Zahl der C-Atome in der Alkylkette (II.3) (bei den Carboxylaten unter Einbeziehung der Carboxylgruppe).

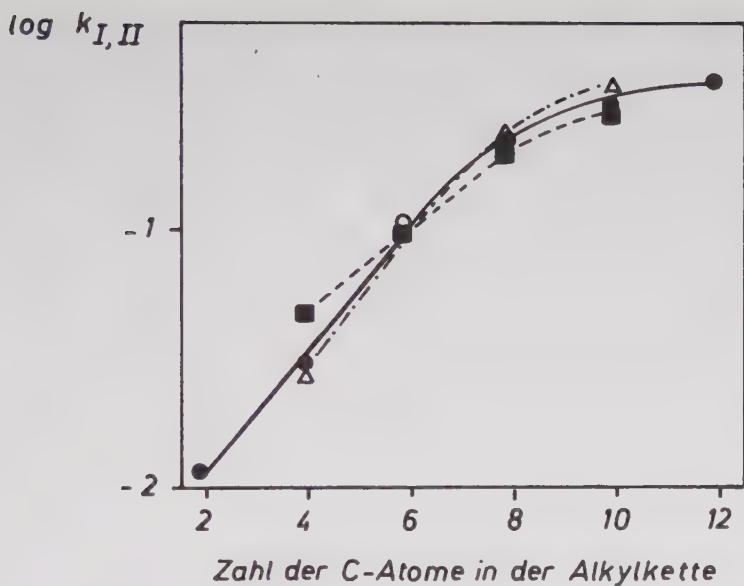


Abb. 10 : Logarithmen der Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten $k_{I,II}$ homologer Tridihexethylsalze in Abhängigkeit von der Zahl der C-Atome in der Alkylkette homologer Salze

(Temp.: $37 \pm 1^\circ\text{C}$; Anfangskonzentration c_{I0} : $2 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$)

- Tridihexethyl-n-alkylsulfonate
- Δ Tridihexethyl-n-alkylsulfate
- Tridihexethyl-n-carboxylate

Mit weiterer Kettenverlängerung weichen die $k_{I,II}$ - Werte wiederum vom linearen Verlauf ab und nähern sich einem Grenzwert von $\text{ca. } 4 \cdot 10^{-1} \text{ (Std.}^{-1}\text{)}$. Damit ist mit steigender Lipophilie bzw. steigendem Verteilungskoeffizienten nicht mehr die

Diffusion durch die Lipidmembran allein, sondern zunehmend auch die Diffusion durch die wäßrigen, adhärierenden Schichten an der Membran in Kompartiment I und II geschwindigkeitsbestimmend (34, 47a, 73, 76, 98, 115, 121). Der asymptotische Grenzwert wird erreicht, wenn $k_w \ll k_m \cdot S$ bzw. $\frac{D_w}{d_w} \ll \frac{D_{org} \cdot S}{d_{org}}$, wobei D_w und D_{org} die Diffusionskoeffizienten in der wäßrigen bzw. organischen Phase, d_w und d_{org} die Dicken der wäßrigen adhärierenden Schichten bzw. der organischen Membran sowie S den entsprechenden n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten bezeichnen (vergl. Gl. 7). Für diese Verschiebung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes spricht auch, daß Vergrößerung der Dicke der wäßrigen, adhärierenden Schichten an der Lipidmembran (51, 73, 90, 98) durch Verringerung der Strömungsgeschwindigkeit an der Membran eine Erniedrigung der $k_{I,II}$ - Werte erst ab dem Octylhomologen der Tridihexethyl-n-alkylsulfonate nach sich zieht (Abb. 11). In jedem Fall erfolgt bei der Diffusion Übertritt der Tridihexethylkationen von Kompartiment I in Kompartiment II zusammen mit ihren Gegenionen, wie Leitfähigkeitsmessungen zeigen (siehe exptl. Teil).

Auch andere Salze des Tridihexethyls mit unterschiedlich hydrophilen bzw. lipophilen Eigenschaften lassen sich in den Kurvenverlauf der Tridihexethyl-n-alkylsulfonate mit einbeziehen, wenn die Logarithmen der Produkte der $k_{I,II}$ - Werte nicht gegen die Zahl der Kohlenstoffatome in der Alkylkette sondern gegen die Logarithmen der Produkte aus dem relativen Diffusionswert in n-Octanol und dem entsprechenden experimentellen Verteilungskoeffizienten aufgetragen werden (Abb. 12).

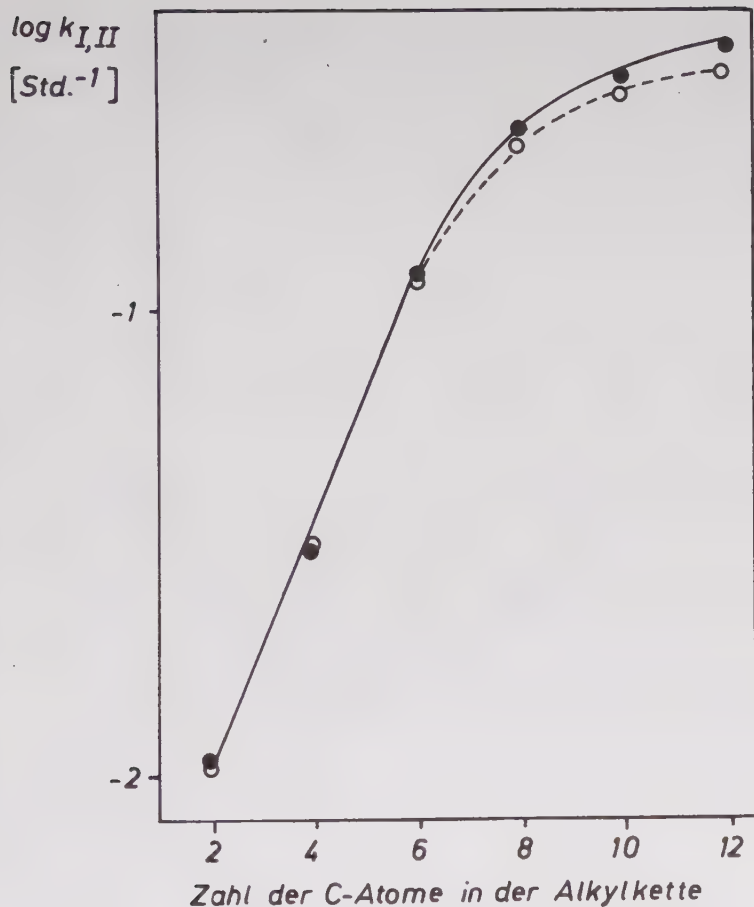


Abb. 11 : Logarithmen der Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten $k_{I,II}$ homologer Tridihexethyl-n-alkylsulfonate bei a) normaler und bei b) verringerter Pumpgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zahl der Kohlenstoffatome in der Alkylkette

a) ● normale Pumpgeschwindigkeit (9 ml/min.)
b) ○ verringerte Pumpgeschwindigkeit (4,5 ml/min.)

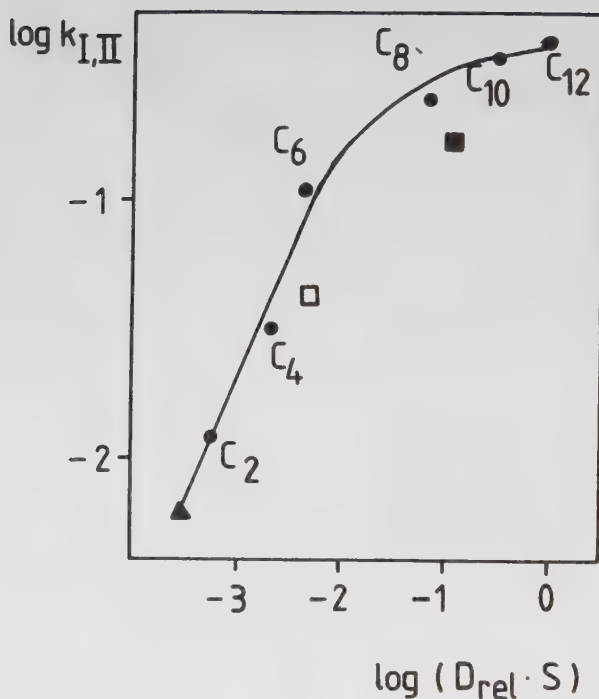


Abb. 12 : Logarithmen der Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten $k_{I,II}$ homologer Tridihexethyl-n-alkylsulfonate sowie der Chlorid-, o-Benzoesäuresulfimid- und Metamizol-salze des Tridihexethyls in Abhängigkeit von den Logarithmen der Produkte aus relativem Diffusionswert D_{rel} und experimentellem Verteilungskoeffizienten S

- ▲ Tridihexethylchlorid
- o-Benzoesäuresulfimidsalz des Tridihexethyls
- Metamizolsalz des Tridihexethyls
- Tridihexethyl-n-alkylsulfonate

Auch bei dieser Auftragung wird die Abweichung vom linearen Verlauf deutlich; wobei das Chlorid-, o-Benzoesäuresulfimid- und Metamizolsalz des Tridihexethyls offensichtlich den gleichen Gesetzmäßigkeiten gehorcht wie die homologen Salze. Damit sind die relativen Diffusionswerte bei verteilungskontrollierter Membrandiffusion nur innerhalb einer homologen Reihe von untergeordneter Bedeutung. Dafür spricht, daß die Steigung der Geraden der Tridihexethyl-n-alkylsulfonate, bei der bis zum Hexylsalz die Logarithmen der Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten $k_{I,II}$ in Abhängigkeit von den Logarithmen der experimentellen n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten aufgetragen werden ($= 0,87$) nur geringfügig von der Steigung aus obengenannter Auftragung ($= 0,85$) bei Einbeziehung der anderen beiden hydrophilen Salze abweicht ⁺. Die Steigung bei Auftragung der $\log k_{I,II}$ - Werte aller hydrophilen Salze gegen die Logarithmen der entsprechenden Verteilungskoeffizienten läßt nur eine Steigung von $0,78$ ⁺⁺ errechnen. Dies zeigt, daß bei Einbeziehung anderer Salze die relativen Diffusionswerte entsprechend berücksichtigt werden müssen.

⁺ Bestimmtheitsmaß r^2 der Geraden : $0,93$ bzw. $0,94$

⁺⁺ Theoretisch müßte sich bei konstanten Diffusionskoeffizienten eine Steigung von 1 ergeben, da sich aus Gl. 7 nach Logarithmieren $\log k_{I,II} = \log \frac{D \cdot F}{d \cdot V} + \log S$ ergibt. Die Abweichung zeigt, daß eigentlich die Diffusionskoeffizienten berücksichtigt werden müssen, da F , d sowie V experimentell festgelegt sind.

4. Membranbindung

Die untersuchten quartären Ammoniumverbindungen weisen unterschiedliche Bindung an die mit n-Octanol getränkten Zellulosenitratfilter auf. Bei den eingesetzten Tridihexethyl-n-alkylsulfonaten, -n-alkylsulfaten und -carboxylaten findet in erster Linie eine Verteilung der Salze in das in den Poren enthaltene n-Octanol statt.

Im Falle der homologen Benzilsäurecholinesterbromide ist zusätzlich Bindung an das Filtermaterial zu beobachten. In Gegenwart von n-Octanol scheint die Bindung an die Zellulosenitratfilter bevorzugt abzulaufen, da die in Wasser gequollenen, n-Octanol-freien Membranen sehr wenig sorbieren (Tab. 4). Der von der Lipidbarriere (= Stüttschicht + n-Octanol) gebundene Arzneistoffanteil setzt sich demnach zusammen aus der an das Membranfilter gebundenen und der in das n-Octanol verteilten Menge ($m_M + m_O$). Daher gilt für den experimentellen Verteilungskoeffizienten VK'_B + zwischen Barriere B mit dem Volumen V_B und der wäßrigen Lösung mit dem Volumen V:

$$VK'_B = \frac{m_B/V_B}{(m_{I\infty} + m_{II\infty})/V} \quad (Gl. 10)$$

wobei $(m_{I\infty} + m_{II\infty})/V = c_{I\infty} = c_{II\infty}$ = Gleichgewichtskonzentrationen der wäßrigen Lösungen.

Das Volumen V_B der Barriere B setzt sich zusammen aus dem Volumen V_M der Stützmembran M und dem Volumen des in der Barriere enthaltenen n-Octanol V_O . Dementsprechend lassen sich für die

* Aus den Membrandiffusionsversuchen in III.2 und III.3 bestimmt.

darin enthaltenen Arzneistoffanteile experimentelle, d.h. konzentrationsabhängige Membranbindungskonstanten errechnen:

$$VK'_M = \frac{m_M / V_M}{(m_{I\infty} + m_{II\infty})/V} \quad (Gl. 10a)$$

Aus den bereits bekannten n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten S (73) werden unter Berücksichtigung der Volumenverhältnisse V_0/V die zur Berechnung von m_M benötigten Mengen m_0 ermittelt ($m_M = m_B - m_0$). Entsprechend Gl.10a lassen sich auch die Membranbindungskonstanten VK'_{Mw} für die Bindung der Arzneistoffe an die in Wasser gequollene, n-octanolfreie Barriere bestimmen (Tab. 4).

In Abb. 13 sind die Membranbindungskonstanten VK'_B für die Gesamtbarriere, die errechneten Membranbindungskonstanten VK'_M sowie die Membranbindungskonstanten VK'_{Mw} für die in Wasser gequollene Stüttschicht halblogarithmisch gegen die Kettenlänge des Alkylrestes aufgetragen. Die Geraden werden durch die in Gl. 3 angegebene Beziehung beschrieben. Die Achsenabschnitte sowie die Steigungen sind in Tab. 5 angegeben. Zum Vergleich sind die entsprechenden n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten S (73) mit angegeben.

Abb. 13 zeigt, daß die Membranbindungskonstanten VK'_B wesentlich höher liegen als die experimentellen Verteilungskoeffizienten S der homologen Benzilsäurecholinesterbromide, höher auch als die Stüttschicht/Wasser-Bindungskonstanten VK'_{Mw} . Die im Vergleich zu den n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten geringen Unterschiede in den ermittelten VK'_B und VK'_M - Werten weisen darauf

hin, daß die Membranbindung im Fall der homologen Benzilsäurecholinesterbromide weniger durch eine Verteilung in das n-Octanol bedingt ist, sondern hauptsächlich durch eine Bindung in der Stützschrift. Daß diese bei der in Wasser gequollenen Stützschrift geringer ausfällt, dürfte auf bevorzugte Sorption der Arzneistoffmoleküle aus n-Octanol bedingt sein. In der Stützschrift sind wie im Fall von Zelluloseacetat (114a) anionische Gruppen vorstellbar, durch die ein Ionenaustausch der quartären Ammoniumverbindungen ermöglicht wird. In Gegenwart von n-Octanol erfolgt auf Grund dessen niedriger Dielektrizitätskonstante die Ionenpaarbildung bevorzugt (69, 70). Es ist anzunehmen, daß sich diese Bindung mit zunehmender Kettenlänge durch Nebenvalenzkräfte zwischen der lipophilen Seitenkette und dem Membrangerüst verstärkt, allerdings nicht in dem gleichen Maß wie die Verteilung in das n-Octanol. Damit ergeben sich kleinere Hansch-Konstanten (Tab. 5).

Im Falle der Tridihexethylsalze erlaubt die Meßgenauigkeit lediglich die Bestimmung des sorbierten Anteils beim Tridihexethyldecyl- und -dodecylsulfonat. Dieser beträgt 2,04 bzw. 6,38%. Entsprechend Gl. 10 ergeben sich VK_B^I - Werte von 8,5 bzw. 26,6 , welche von gleicher Größenordnung sind wie die entsprechenden n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten. Die Hansch-Konstante für die VK_B^I - Werte liegt allerdings niedriger (0,25) als die der Verteilung (0,36).

Tab. 4 : Versuchsspezifische Membranbindungskonstanten VK'_B , VK'_M und VK'_{Mw} homologer Benzilsäurecholin-esterbromide (Anfangskonzentration $c_{I0} = 2,0 \cdot 10^{-3}$ Mol/l)

Zahl der C- Atome in der Alkylkette	VK'_B	VK'_M	VK'_{Mw}
5	2,3	5,0	-
6	4,8	10,3	-
7	10,3	22,1	-
8	13,5	28,3	4,5
9	28,4	59	-
10	39,7	80	18,2
11	69	139	-
12	122	233	59

Tab. 5 : Achsenabschnitte und Steigungen der Geraden aus den versuchsspezifischen Membranbindungskonstanten sowie n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten

	VK'_B	VK'_M	VK'_{Mw}	S^+
Achsenab- schnitt	0,18	0,43	$2,75 \times 10^{-2}$	$5,62 \times 10^{-4}$
Steigung π	0,24	0,23	0,28	0,43

⁺ aus (73)

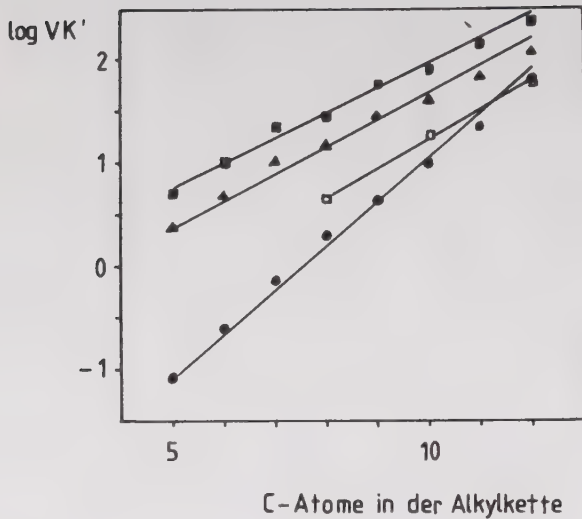


Abb. 13 : Logarithmen der versuchsspezifischen Membranbindungskonstanten VK'_B , VK'_M und VK'_{Mw} sowie Logarithmen der experimentellen n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten S homologer Benzilsäurecholinester in Abhängigkeit von der Zahl der C-Atome in der Alkylkette

Anfangskonzentration $c_{Io} = 2,0 \cdot 10^{-3}$ Mol/l

- ▲ : VK'_B (Gesamtbarriere/Wasser)
- : VK'_M (Stützschiicht/n-Octanol)
- : VK'_{Mw} (Stützschiicht/Wasser)
- : S (n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient)

5. Zusammenfassung von Gesetzmäßigkeiten der Membrandiffusion

Allgemein lassen sich für die Membrandiffusion quartärer Ammoniumverbindungen folgende Gesetzmäßigkeiten ableiten:

- a) Die Diffusion der Salze durch Lipidmembranen erfolgt in Form von Ionenpaaren.
- b) Die Geschwindigkeit der Membranpassage kann durch Erhöhung des experimentellen Verteilungskoeffizienten S gesteigert werden, allerdings nur bis zu einem Grenzwert. Dabei läßt sich nachweisen, daß eine Verlängerung der Alkylkette und damit der Lipophilie am Arzneistoffkation wie auch am Gegenion gleichen Einfluß auf die Übertrittsgeschwindigkeit besitzt. Zu berücksichtigen ist, daß neben einer Verteilung der Salze in die Lipidphase der Barriere zusätzlich Bindung an die Stützschiicht auftreten kann.
- c) Bei verteilungskontrollierter Membrandiffusion sind die jeweiligen Diffusionskoeffizienten bzw. relativen Diffusionswerte innerhalb einer homologen Reihe von untergeordneter Bedeutung, müssen aber bei Einbeziehung anderer Salze berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen zur Membrandiffusion lassen erwarten, daß unter In-vivo-Verhältnissen die Resorption quartärer Ammoniumverbindungen durch passive Diffusion elektrisch neutraler Ionenpaare vor sich geht. Die Bioverfügbarkeit dieser Arzneistoffe dürfte allerdings wie schon die Membrandiffusion keine einfache Funktion ihrer lipophilen Eigenschaften sein.

IV. UNTERSUCHUNGEN ZUR

RESORPTION VON SALZEN DES TRIDIHEXETHYLS

1. Allgemeines

Die vorliegenden In-vitro-Untersuchungen haben ergeben, daß die Membranpassage hydrophiler, dissoziierter Arzneistoffe durch Kettenverlängerung des Arzneistoffions oder auch des Gegenions zumindest bis zu einem Grenzwert verbessert werden kann. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Resorption dissoziierter Arzneistoffe bleibt abzuklären. Aus Versuchen zur buccalen Resorption homologer Benzilsäurecholinesterbromide ergibt sich z.B. nur eine lineare Abhängigkeit der Resorptionsgeschwindigkeitskonstanten k_r von der Kettenlänge (75). Dagegen entsprechen Untersuchungsbefunde zur Resorption von n-Alkylcarbonsäuren und p-n-Alkylphenylelessigsäuren durch die Mundschleimhaut die Hypothese, daß die Resorption nicht grundsätzlich mit steigendem Verteilungskoeffizienten verbessert wird (75). Allerdings stellt sich hierbei die Frage, ob Ergebnisse zur buccalen Resorption zu verallgemeinern sind, nachdem die Bindung von Arzneistoff an Eiweiß und Mucine der Mucosa üblicherweise unberücksichtigt bleibt. Außerdem ist zu bedenken, daß derartige Veränderungen am Arzneistoff nicht nur zu einer Beeinflussung der Resorptionseigenschaften führen dürften. Vielmehr ist zu erwarten, daß sich auch die Wirkungsqualität verändert (23).

Einzelne In-vivo-Befunde zeigen, daß sich durch Zusatz lipophiler Gegenionen die Bioverfügbarkeit von hydrophilen dissoziierten Substanzen steigern läßt (44, 52, 122). Allerdings

kann zu hohe Lipophilie die Membranpassage auch behindern (28, 39, 68, 82). Als Ursache dafür wird unter anderem Verringerung der Löslichkeit angeführt (129).

Untersuchungen des Resorptionsverhaltens der homologen Tridihexethyl-n-alkylsulfonate sollen helfen abzuklären, ob und in welchem Umfang die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffkationen ohne Änderung der Wirkungsqualität durch eine pharmazeutisch-technologische Maßnahme, nämlich Einsatz von Gegenionen, verbessert werden kann.

2. Akute Toxizität nach intraperitonealer Injektion an der Maus

Am Beispiel der homologen Tridihexethyl-n-alkylsulfonate wird überprüft, in welcher Weise sich eine Veränderung der Lipophilie der Gegenionen auf das Toxizitätsverhalten des Spasmolytikums nach i.p.-Injektion auswirkt. Hierzu erfolgt Bestimmung der Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben ($= LD_{50}$) nach entsprechender Applikation wäßriger Lösungen der homologen Salze an Mäusen. Da auch bei Resorption aus dem Peritoneum eine Passage durch Lipidbarrieren stattfindet (7, 21), kann der reziproke Wert der LD_{50} nach entsprechender Applikation als Maß für die Geschwindigkeit der Diffusion durch Biomembranen dienen⁺. In Tab. 6 sind die LD_{50} - Werte der homologen Salze aufgeführt.

⁺ Vergleichbare Korrelationsversuche von LD_{50} und Resorptionsvorgängen beschreiben verschiedene Autoren (4, 5, 19, 86, 112, 119, 127).

Tab. 6 : Akute Toxizität homologer Tridihexethyl-n-alkylsulfonate und von Tridihexethylchlorid nach intraperitonealer Injektion an der Maus

Gegenion	LD ₅₀ ^(+s) (10 ⁴ Mol/kg)
C ₂ H ₅ SO ₃ ⁻	3,69 [±] 0,29
C ₄ H ₉ SO ₃ ⁻	3,11 [±] 0,26
C ₆ H ₁₃ SO ₃ ⁻	2,82 [±] 0,25
C ₈ H ₁₇ SO ₃ ⁻	1,89 [±] 0,19
C ₁₀ H ₂₁ SO ₃ ⁻	1,80 [±] 0,23
Cl ⁻	2,91 [±] 0,34

Durch Auftragen von $\log \frac{1}{LD_{50}}$ (10⁴ Mol/kg)⁻¹ gegen den Logarithmus der experimentellen Verteilungskoeffizienten S (siehe II. 3) erhält man entsprechend der Hanschen Gleichung (47) einen linearen Zusammenhang (Abb. 14), der sich durch Gl. 11 beschreiben läßt:

$$\log \left(\frac{1}{LD_{50}} \right) = a \cdot \log S + b \quad (\text{Gl. 11})$$

Dabei bezeichnen $\left(\frac{1}{LD_{50}} \right)$ den reziproken Wert der LD₅₀ des n-ten Homologen, S den entsprechenden experimentellen Verteilungskoeffizienten, a die Steigung und b den Achsenabschnitt der Geraden⁺. Mit zunehmender Kettenlänge der

⁺ Steigung a = 0,11; Achsenabschnitt b = 4570.

homologen Gegenionen erhöht sich die Toxizität der Salze, obwohl diese offensichtlich auf das Kation zurückzuführen ist: Bei dreifacher (im Falle des Na-C₁₀-sulfonats: zweifacher) Dosis der jeweiligen LD₅₀ zeigen die entsprechenden Natriumsalze der homologen Alkylsulfonate keine Toxizität.

Die Unterschiede der LD₅₀ - Werte der einzelnen homologen Salze sind signifikant (90% Vertrauensbereich). Der angeführte Zusammenhang weist darauf hin, daß die mit Kettenverlängerung ansteigende Lipophilie der Gegenionen die Ursache für die Erhöhung der Toxizität ist.

Das ebenfalls untersuchte Tridihexethylchlorid verhält sich allerdings abweichend: Trotz seines niedrigen experimentellen Verteilungskoeffizienten von $4,9 \cdot 10^{-3}$ besitzt es eine LD₅₀ von 2,91 (10^4 Mol/kg), welche zwischen der des Butyl- und Hexylhomologen liegt.

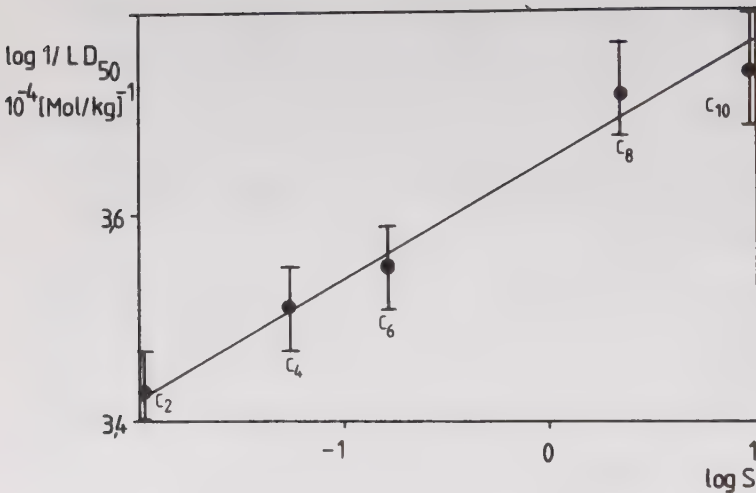


Abb. 14 : Logarithmen der reziproken LD₅₀-Werte in Abhängigkeit von den Logarithmen der entsprechenden n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten S homologer Tridecylhexethyl-n-alkylsulfonate ([±] s)

In Abb. 15 erfolgt Berücksichtigung der relativen Diffusionswerte in n-Octanol (siehe II.4). Sie ergibt für das Chloridsalz lediglich eine Annäherung des Produktes $\log (D_{\text{rel}} S)$ ($= \log (6,1 \cdot 10^{-2} \cdot 4,9 \cdot 10^{-3}) = -3,52$) an den Kurvenverlauf in Abb. 15. Allerdings könnte die in Abb. 15 auftretende Abweichung des Decylhomologen auf ein Einschwenken in eine Asymptote hinweisen. Zumindest stellt diese Auftragung sicher, daß die vermutete Abweichung nicht eine Folge unterschiedlicher Diffusionskoeffizienten der einzelnen Homologen darstellt: Durch Berücksichtigung der relativen Diffusionswerte wird deren Einfluß eliminiert.

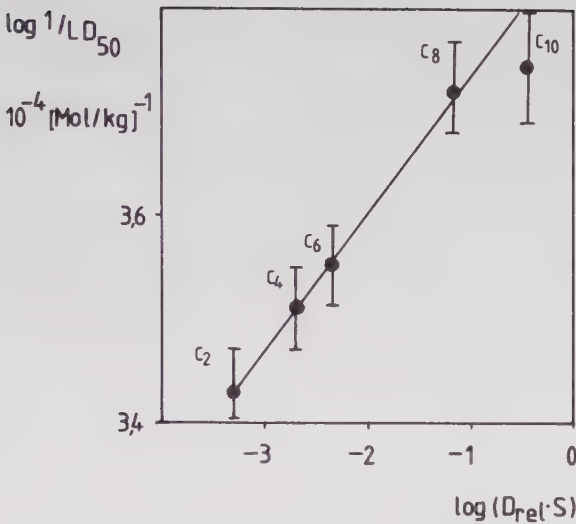


Abb. 15 : Logarithmen der reziproken LD_{50} -Werte in Abhängigkeit von den Logarithmen der Produkte aus relativem Diffusionswert D_{rel} und experimentellem Verteilungskoeffizienten S ($^+ s$)

Ähnliche Hinweise ergibt die Auswertung der Zeiten bis zum Eintritt des Todes der Tiere (LT): Die harmonischen Mittel $^+ M$ der Beobachtungswerte zeigen einen deutlichen Abfall vom

$^+$ Nach L.Cavalli-Sforza ist es zweckmäßig, das harmonische Mittel M zu verwenden, wenn die Zeit als Beobachtungsmerkmal vorliegt und Zeitwerte von $t = \infty$ auftreten (13).

Ethyl- zum Butylderivat und von hierab einen annähernd konstanten Verlauf (Tab. 7). Werden die Logarithmen der der reziproken harmonischen Mittel M zu den Logarithmen der Verteilungskoeffizienten S der Homologen in Beziehung gesetzt, so zeigt sich nach einem Anstieg vom Ethyl- zum Butylsalz ein annähernd geradliniger Verlauf (Tab. 7). Jedoch läßt sich auch hier das Tridihexethylchlorid nicht entsprechend seinem Verteilungskoeffizienten einordnen.

Tab. 7 : Harmonische Mittel M der Zeiten bis zur Letalität nach i.p.-Injektion von Lösungen homologer Tridihexethyl-n-alkylsulfonate und von -chlorid

Gegenion	M (min)	$\log \left(\frac{1}{M} \right) (\text{min}^{-1})$
$\text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_3^-$	25,6	- 1,41
$\text{C}_4\text{H}_9\text{SO}_3^-$	7,6	- 0,88
$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{SO}_3^-$	10,1	- 1,0
$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_3^-$	8,1	- 0,91
$\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{SO}_3^-$	12,1	- 1,08
Cl^-	9,5	- 0,98

Insgesamt zeigen die Untersuchungen zur Toxizität, daß mit steigender Lipophilie der Gegenionen die toxische Wirkung zunimmt. Dabei ergeben sich Hinweise für einen asymptotischen Verlauf.

3. Spasmolytische Wirkung am isolierten Jejunum der Ratte

Ziel dieser Untersuchungen ist die Ermittlung derjenigen Konzentration an Spasmolytikum, die die Kontraktion eines Jejunum-Abschnitts nach Zusatz von Acetylcholin um 50% vermindert ($= ID_{50}$). Für zwei Salze mit stark unterschiedlich lipophilen Eigenschaften, nämlich Tridihexethylethylsulfonat und -dodecylsulfonat sowie der extrem hydrophilen Ausgangssubstanz Tridihexethylchlorid werden kumulative Dosis-Wirkungskurven nach van Rossum und van den Brink (125) an Jejunum-Abschnitten von Ratten erstellt (Abb. 16, 17, 18). Damit soll abgeklärt werden, ob die Gegenionen des Tridihexethyls seine spasmolytische Aktivität am isolierten Organ beeinflussen.

Die Untersuchung der drei Salze erfolgt bei jeweils 3 Konzentrationen, nämlich $1,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l, $5,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l und $1,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. Alle untersuchten Tridihexethylsalze zeigen am isolierten Jejunum der Ratte cholinolytische Eigenschaften. Durch fortlaufende Erhöhung der Acetylcholin-Konzentration wird die Hemmwirkung der Substanzen aufgehoben. Das Kontraktionsmaximum wird in Abhängigkeit steigender Inhibitorkonzentrationen nicht vermindert sondern lediglich die Dosis-Wirkungskurve in Richtung höherer Konzentrationen an Spasmolytikum parallel verschoben. Damit erweisen sich die untersuchten Substanzen in ihrem spasmolytischen Wirkungsmechanismus als kompetitive Hemmstoffe.

In Abb. 16, 17 und 18 sind die relativen Kontraktionen zu der durch Acetylcholin erreichten Maximalkontraktion in % gegen

die negativen dekadischen Logarithmen der molaren Acetylcholin-Konzentration aufgetragen. Hierzu lassen sich für die drei Salze nach dem Probit-Verfahren ID_{50} - Werte (Tab. 8) berechnen, für die kein signifikanter Unterschied nachweisbar ist (95% Vertrauensbereich) (siehe exptl. Teil).

Tab. 8 : Hemmstoffkonzentration, die die maximale Kontraktion um 50% vermindert (= ID_{50})

Substanz	ID_{50} ($\pm$ s) (10^5 Mol/l)
Tridihexethylethylsulfonat	3,55 ($\pm$ 0,79)
Tridihexethyldecylsulfonat	4,17 ($\pm$ 0,82)
Tridihexethylchlorid	3,09 ($\pm$ 0,77)

Die pharmakodynamische Aktivität am isolierten Jejunum ist demnach unabhängig vom Gegenion. Die Gegenionen selbst zeigen keine spasmolytischen Eigenschaften (siehe exptl. Teil). Wenn sich aber die einzelnen Salze am isolierten Organ in ihrer cholinolytischen Wirkung gleichartig verhalten, dürften Wirksamkeitsunterschiede am Ganztier wie unterschiedliche Toxizität nach i.p.-Injektion auf abweichendes Resorptionsverhalten der verschiedenen Homologen zurückzuführen sein. Untersuchungen zur Resorption nach peroraler Applikation von Tridihexethylethylsulfonat und Tridihexethyldecylsulfonat werden an der Maus und am Hund durchgeführt.

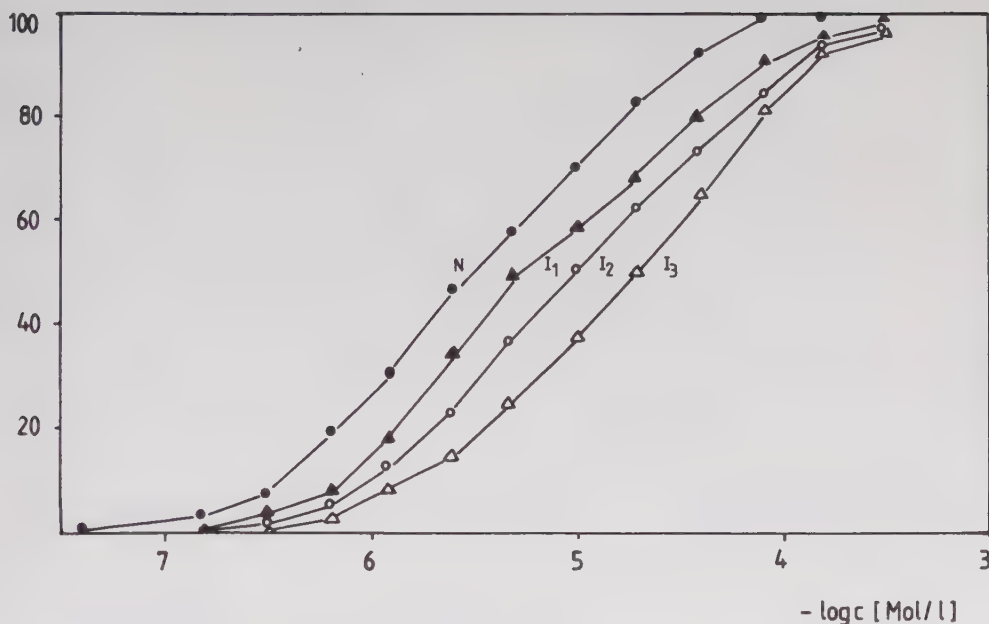


Abb. 16 : Wirkung von Tridihexethylethylsulfonat an
Jejunumabschnitten
Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung von
Acetylcholin am Jejunum der Ratte in Abhängigkeit
von der Hemmstoffkonzentration

Ordinate: Kontraktion relativ zu der durch Acetylcholin
erreichten Maximalkontraktion in %

Abszisse: negativer dekadischer Logarithmus der molaren
Acetylcholin-Konzentration

N = unbeeinflusste Dosis-Wirkungskurve

I_I = $1,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l; I₂ = $5,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l;

I₃ = $1,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l des Hemmstoffs

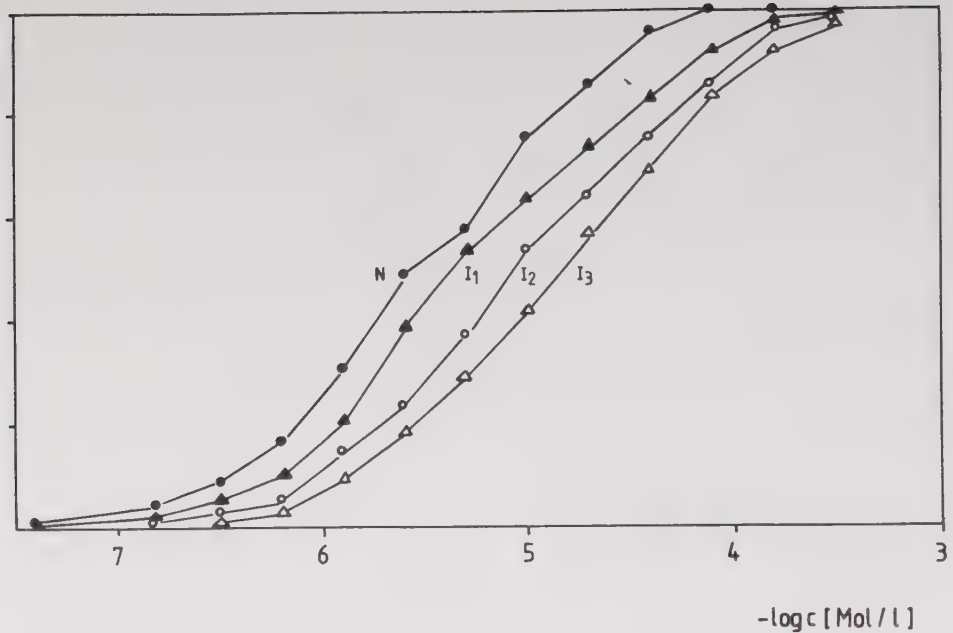


Abb. 17 : Wirkung von Tridihexethyldodecylsulfonat an
Jejunumabschnitten
Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung von
Acetylcholin am Jejunum der Ratte in Abhängigkeit
von der Hemmstoffkonzentration

Ordinate : Kontraktion relativ zu der durch Acetylcholin
erreichten Maximalkontraktion in %

Abszisse : negativer dekadischer Logarithmus der molaren
Acetylcholinkonzentration

N = unbeeinflusste Dosis-Wirkungskurve

$I_1 = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$; $I_2 = 5,0 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$; $I_3 = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$
des Hemmstoffs

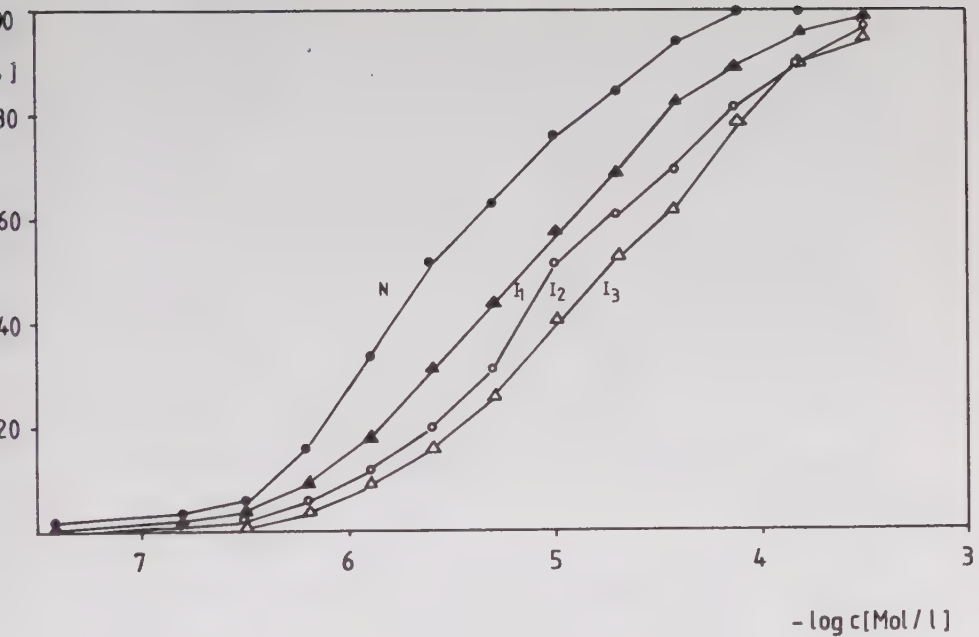


Abb. 18 : Wirkung von Tridihexethylchlorid an Jejunumabschnitten

Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung von Acetylcholin am Jejunum der Ratte in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration

Ordinate: Kontraktion relativ zu der durch Acetylcholin erreichten Maximalkontraktion in %

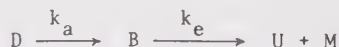
Abszisse: negativer dekadischer Logarithmus der molaren Acetylcholinkonzentration

N = unbeeinflusste Dosis-Wirkungskurve

$I_1 = 1,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l; $I_2 = 5,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l; $I_3 = 1,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
des Hemmstoffs

4. Ausscheidung nach peroraler Applikation an der Maus

Zur Untersuchung kommen zwei Salze mit stark unterschiedlichem Verteilungskoeffizienten, nämlich Tridihexethylethylsulfonat und Tridihexethyldecylsulfonat. Nach peroraler Applikation mittels Schlundsonde ⁺ wird das Tridihexethylkation mittels Ionenpaarextraktion in Urin und Faeces bestimmt (siehe exptl. Teil). Abb. 19 zeigt, daß in beiden Fällen der größte Anteil unveränderter Substanz in den Faeces zu finden ist. Dabei kann allerdings nicht differenziert werden, ob es sich dabei allein um nicht resorbierten oder auch um biliär wieder ausgeschiedenen Arzneistoff handelt. Die Unterschiede zwischen den Arzneistoffmengen für die beiden Salze sind nach 24 Std. für 95%, für 48 und 72 Std. für 90% Vertrauensbereich signifikant. Die renale Ausscheidung bleibt bei beiden Homologen gering, jedoch ist auch sie signifikant unterschiedlich (95% Vertrauensbereich für 24, 48 und 72 Std.), (Abb. 19): Es gelangt vom Ethylsulfonat weniger in den Urin, nachdem der Anteil in den Faeces größer ist. Wenn ausschließlich Daten für die Ausscheidung eines Arzneistoffs (oder seiner Metaboliten) im Urin verfügbar sind, ist die Anpassung von pharmakokinetischen Modellen erheblich eingeschränkt (41). Das einfachste, in diesem Fall anzuwendende bzw. zu überprüfende Modell ist das offene Ein-Kompartimentmodell mit einer Resorption nach erster Ordnung:



⁺ Hierbei wird Eintritt an spasmolytischer Wirkung nach ca. 15 Minuten beobachtet, ein Hinweis auf rasche Resorption.

Dabei sind D die gegebene Dosis, B die Arzneistoffmenge im Organismus, U bzw. M die Arzneistoffmenge in Urin bzw. die durch Metabolisierung eliminierte Menge an Arzneistoff sowie k_a und k_e die Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung für die Resorption bzw. Elimination.

Unter der Annahme einer Ausscheidung 1. Ordnung und eines konstanten Verhältnisses von U/M gilt für deren Geschwindigkeit:

$$dU/dt = k_{B,U} (U_{\infty} - U) \quad (Gl. 12)$$

Integration ergibt $\log (U_{\infty} - U) = \log U_{\infty} - (k_{B,U}/2,303) \cdot t$

Dementsprechend werden die Logarithmen der Differenzen 100% - % ausgeschieden gegen die Zeit aufgetragen (Abb.20). Es ergeben sich Geraden; das Modell entspricht den vorliegenden Daten.

Im Untersuchungszeitraum erhält man für das hydrophile homologe Salz eine Ausscheidungskonstante $k_{B,U}$ von $0,046 \text{ Std}^{-1}$, für das lipophile eine von $0,041 \text{ Std}^{-1}$ bei graphischer Extrapolation von U_{∞} zu 6% (Ethylsulfonat) bzw. 10,8% (Decylsulfonat) der eingesetzten Mengen (Abb. 19). Die Halbwertszeiten errechnen sich zu 15,1 bzw. 16,9 Std.. Die Prüfung auf Parallelität der beiden Geraden ergibt, daß diese für 95% Vertrauensbereich anzunehmen ist.

Damit können die beiden Ausscheidungsgeschwindigkeitskonstanten $k_{B,U}^{C_2}$ und $k_{B,U}^{C_{10}}$ bzw. die beiden entsprechenden Halbwertszeiten als identisch gelten. Wenn sich die beiden Homologen nicht in ihren Ausscheidungsgeschwindigkeitskonstanten unterscheiden,

so ist wiederum unter der Annahme gleicher Metabolisierung die bei dem lipophileren Decylsulfonat⁻salz signifikant größere renale Ausscheidung ein deutlicher Hinweis auf eine verbesserte Resorption aus dem Gastro-Intestinaltrakt, bedingt durch den höheren Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizienten des lipophileren Salzes.

Legt man die resorbierten Anteile nach t_{∞} zu Grunde, so ergibt sich im Mittel ein Verhältnis von 1,8 (Decylsulfonat) zu 1 (Ethylsulfonat).

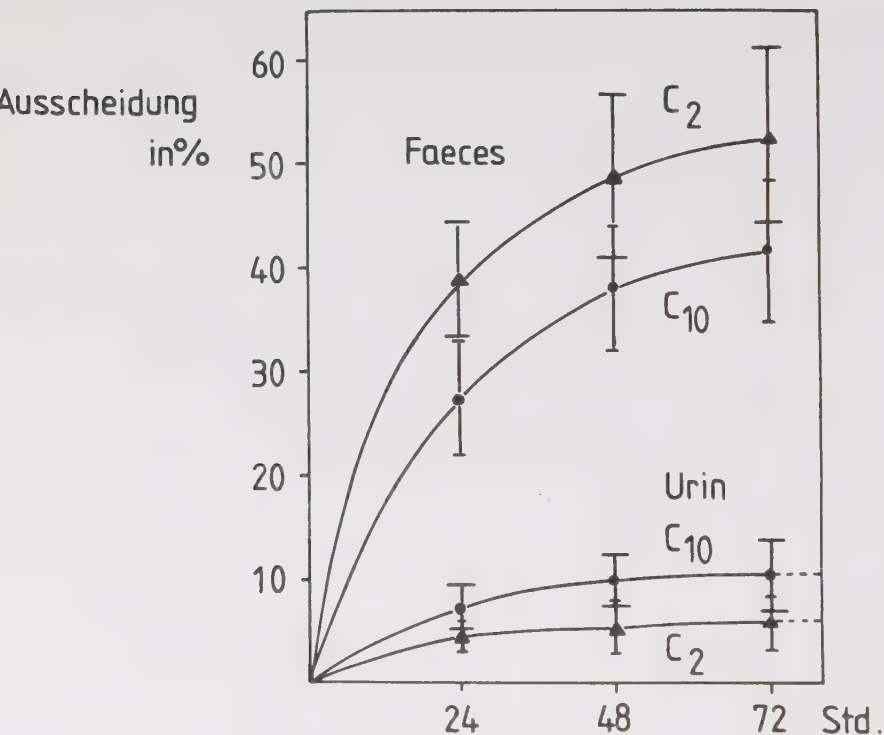


Abb. 19 : Kumulative Ausscheidung von Tridihexethylethylsulfonat (C₂) und -decylsulfonat (C₁₀) mit Urin und Faeces bei der Maus (♂s); Mittelwerte aus jeweils 12 Werten; applizierte Dosis: $7,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/kg

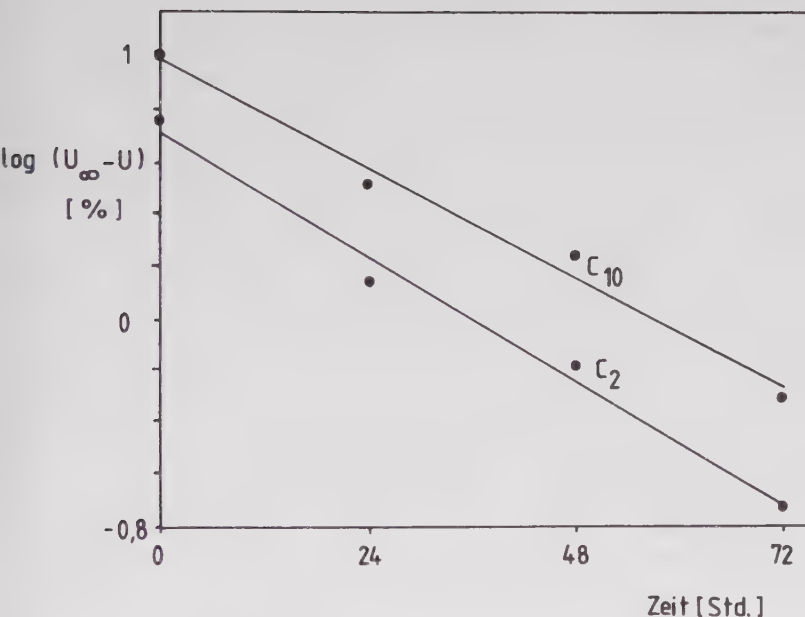


Abb. 20 : Logarithmen der Differenzen 100% - % renal ausgeschieden von Tridihexethylethyl- und -decylsulfonat in Abhängigkeit von der Zeit
Mittelwerte aus jeweils 12 Werten

Dies entspricht einem 80% besseren Ausmaß der Bioverfügbarkeit des lipophileren Salzes bzw. einer relativen Bioverfügbarkeit⁺ von 180%.

⁺ Die relative Bioverfügbarkeit bezeichnet das Verhältnis aus den resorbierten Arzneistoffmengen nach Applikation eines Tests und Standards, multipliziert mit 100 ergeben sich Prozentangaben (68a).

5. Pharmakokinetik von Tridihexethylethyl- und decylsulfonat nach intravenöser und peroraler Applikation am Hund

5.1 Allgemeines

Unterschiedliche renale Ausscheidung verschieden lipophiler Tridihexethylsulfonate nach peroraler Applikation an der Maus zeigen, daß das lipophilere Salz aus dem Gastrointestinaltrakt besser resorbiert wird als das hydrophile. Untersuchungen zur Pharmakokinetik am Hund sollen helfen, diese Ergebnisse zu überprüfen und zu ergänzen. Zu diesem Zweck werden diese beiden Salze, nämlich Tridihexethylethylsulfonat und -decylsulfonat⁺ in einem erweiterten cross-over Versuch (siehe exptl. Teil) jeweils 2 Hunden intravenös sowie peroral nach vorangehender Anaesthesie appliziert und die Arzneistoffkonzentrationen in Plasma und Urin nach Extraktion mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie ermittelt (siehe exptl. Teil).

Zur Auswertung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe werden die jeweiligen Konzentrationen an Arzneistoff im Plasma ($b = B/V$; B bezeichnet die Menge im zentralen Kompartiment, V das zugehörige Volumen) halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. In Abb. 21 (i.v.-Applikation) sind deutlich 2 Phasen im Konzentrations-Zeitprofil zu erkennen: Ein steil abfallender Teil,

⁺ Das im Vergleich zum Decylhomologen noch lipophilere Tridihexethyldodecylsulfonat kann auf Grund seiner zu geringen Löslichkeit in Wasser nicht eingesetzt werden.

sogenannte α - oder Verteilungsphase und ein flach abfallender terminaler Teil, sogenannte β - oder Eliminationsphase. Auf Grund dieses biexponentiellen Verlaufs kann als biologisches Modell ein offenes Zweikompartimentmodell angenommen werden.

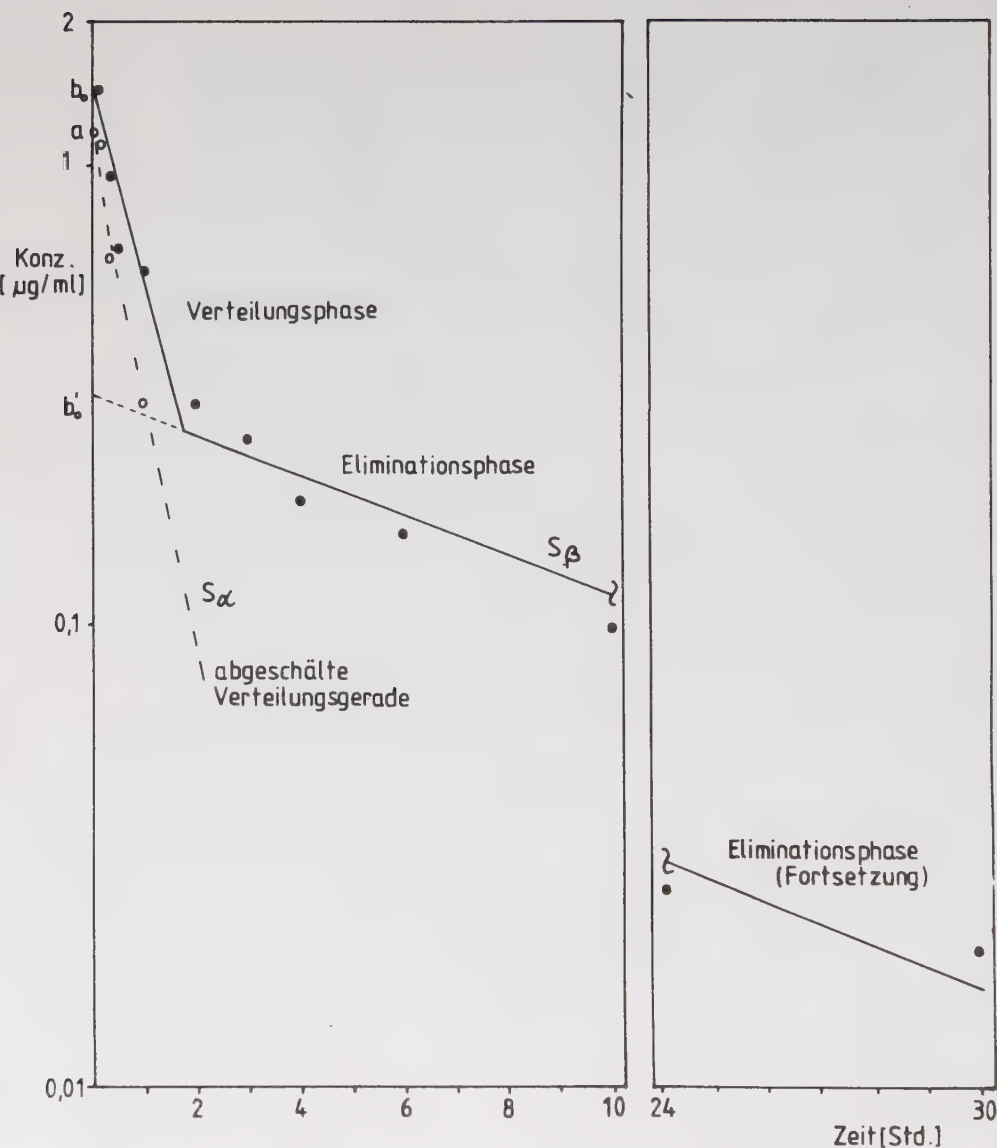
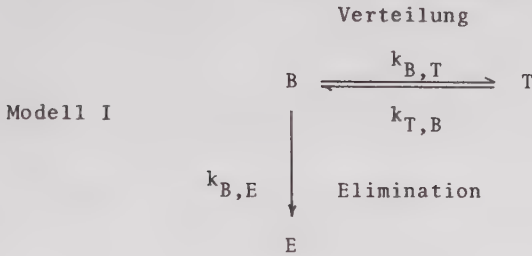


Abb. 21 : Typische Plasmakonzentrations-Zeitkurve von Tri-dihexethyldecylsulfonat nach i.v.-Applikation
Hund II, Versuch 10; applizierte Dosis: 6,5 mg/kg

Hierfür gilt (bei intravenöser Applikation einer Dosis

$$B_0 = D_0) :$$



Die Ab- bzw. Zunahme der Mengen in den einzelnen Kompartimenten wird durch die in den nachfolgenden Differentialgleichungen angegebenen Mikro-Geschwindigkeitskonstanten angegeben. Dabei gilt:

$$D_0 = B_0 = B + T + E = E_{\infty} ;$$

Hierbei bezeichnet T die in einem weiteren, extravasalen Kompartiment vorhandene Menge sowie E die eliminierte Menge. Dabei gelten folgende Differentialgleichungen:

$$a) \quad -dB/dt = (k_{B,T} + k_{B,E}) \cdot B - k_{T,B} \cdot T \quad (Gl. 13)$$

$$b) \quad dT/dt = k_{B,T} \cdot B - k_{T,B} \cdot T \quad (Gl. 14)$$

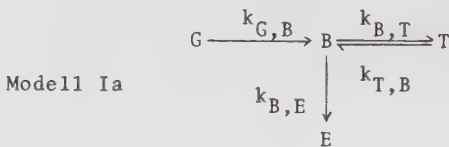
$$c) \quad dE/dt = k_{B,E} \cdot B \quad (Gl. 15)$$

Die jeweils gemessenen Arzneistoffkonzentrationen im Plasma (b) sind über das Verteilungsvolumen V mit den entsprechenden Arzneistoffmengen B verknüpft: $b = B/V$ und $b_0 = B_0/V$, wobei b_0 und B_0 die Anfangskonzentration bzw. Anfangsmenge des Arzneistoffs im zentralen Kompartiment zur Zeit $t = 0$ darstellen.

Die Abschätzung der Mikro-Geschwindigkeitskonstanten für das Zwei-Kompartimentmodell nach i.v.-Applikation wird durch "Abschälen" ermöglicht (siehe exptl. Teil).

5.2 Festlegung des biologischen Modells, Untersuchung der Elimination

Bei der peroralen Applikation ist dem Modell nach i.v.-Gabe eine Resorption mit einer Geschwindigkeit 1. Ordnung vgeschaltet. Damit ergibt sich folgendes biologisches Modell:



Die Differentialgleichungen entsprechen den vorangegangenen der i.v.-Applikation, jedoch wird a) zu:

$$-dB/dt = (k_{B,T} + k_{B,E}) \cdot B - k_{T,B} \cdot T - k_{G,B} \cdot G \quad (Gl.16)$$

sowie zusätzlich

$$-dG/dt = k_{G,B} \cdot G \quad (Gl.17)$$

Bei halblogarithmischer Auftragung der Plasmakonzentrationen nach peroraler Applikation gegen die Zeit ergeben sich zunächst ansteigende Werte, die die Resorptionsphase widerspiegeln. Der anfänglich steil, dann aber flacher abfallende Teil der Kurve repräsentiert die Verteilungs- und Eliminationsphase (α - und β -Phase) (Abb. 22, vergl. dazu Abb.21). Die Abschätzung

der Mikro-Geschwindigkeitskonstanten für das Zwei-Kompartimentmodell nach peroraler Applikation kann wiederum durch "Abschälen" vorgenommen werden (siehe exptl. Teil).

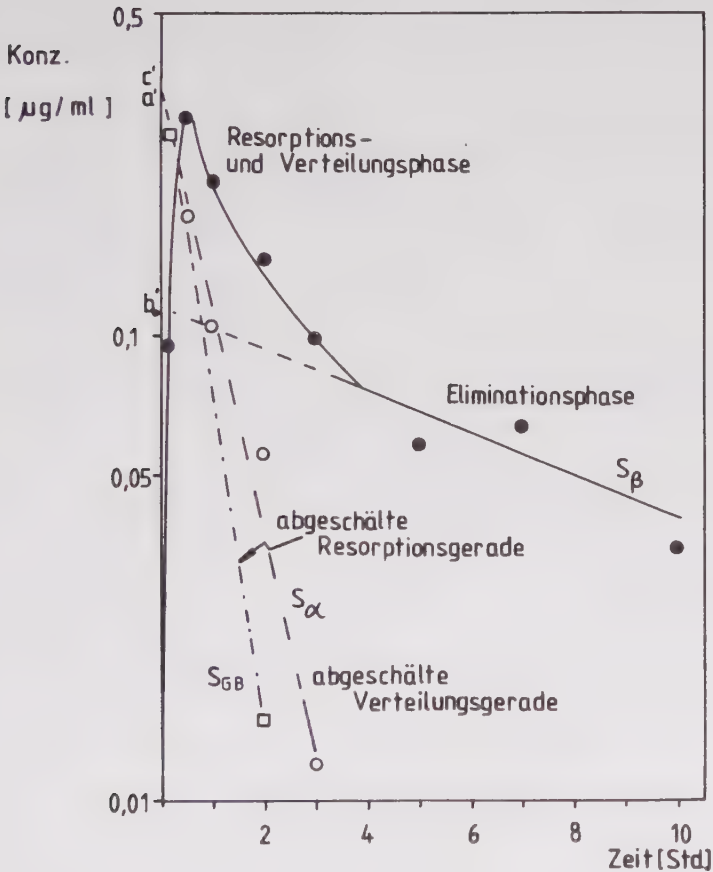


Abb. 22 : Typische Plasmakonzentrations-Zeitkurve von Tridihexethyldecylsulfonat nach peroraler Applikation
Hund I, Versuch 3; applizierte Dosis: 26 mg/kg.

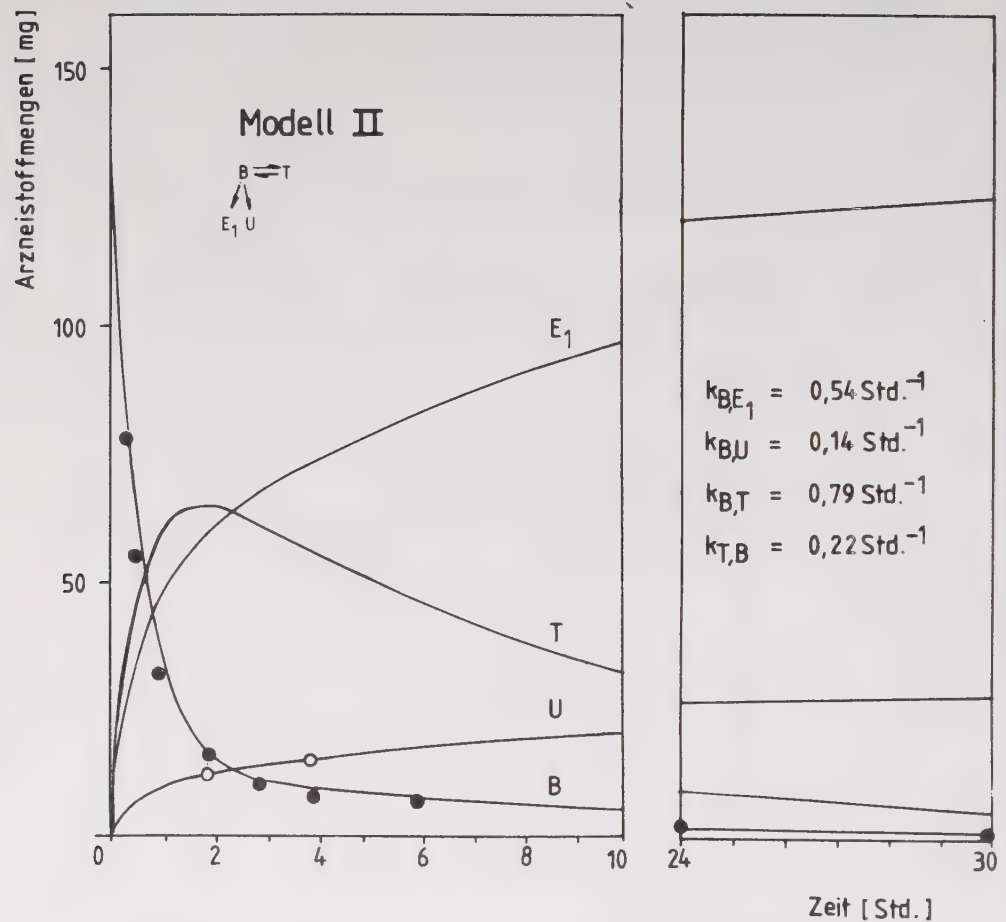


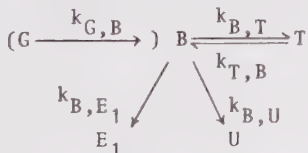
Abb. 23 : Beispiel für einen Analogrechner-"fit":

Verteilung von Tridihexethylethylsulfonat in den
 Kompartimenten B, T, U und E_1 nach i.v.-Applikation
 Hund II, Versuch 2; Punkte: experimentelle Werte;
 Kurven: Am Analogrechner "gefittet"; applizierte
 Dosis: 155 mg.

Aus dem Vergleich der Plasmakonzentrations-Zeitkurve nach i.v. und peroraler Applikation ist ersichtlich, daß die Werte nach peroraler Applikation niedriger liegen als nach i.v.-Applikation, obwohl die Dosis bei ersterer um ein Vierfaches höher eingesetzt wird. Dies ist ein erster Hinweis auf eine unvollständige Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt bzw. einen außerordentlich starken "first pass"-Effekt (siehe dazu S. 67). Gleichzeitig lassen die kurzen Zeiten bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration nach peroraler Applikation darauf schließen, daß die beiden Homologen rasch resorbiert werden.

Wenn auch die einzelnen Mikrokonstanten durch "Abschälen" abgeschätzt werden können, so sind die durch graphische Auftragung ermittelten Werte jedoch ungenau. Allerdings dienen sie als Anhaltspunkt für die Auswertung der experimentellen Daten am Analogrechner (siehe exptl. Teil).

Bei der Auswertung der i.v.-Daten am Analogrechner zeigt sich allerdings folgendes: Eine Anpassung der Kurvenverläufe, die das biologische Modell simulieren, an die experimentellen Werte (= "Fitten") ist für die renale Ausscheidung nicht möglich. Aus diesem Grund erfolgt eine Aufspaltung von E in $E = U + E_1$, wobei U den in den Urin unverändert ausgeschiedenen Arzneistoff E_1 den auf andere Art eliminierten Arzneistoff. Damit erweitert sich Modell I bzw. Ia zu Modell II bzw. IIa:



Somit gelten folgende Differentialgleichungen:

$$a) \quad -dB/dt = (k_{B,T} + k_{B,E_1} + k_{B,U}) \cdot B - k_{T,B} \cdot T \quad (Gl. 18)$$

$$\text{bzw.} \quad -d3/dt = (k_{B,T} + k_{B,E_1} + k_{B,U}) \cdot B - k_{T,B} \cdot T - k_{G,B} \cdot G \quad (Gl. 18a)$$

Weiterhin gilt (neben Gl. 17 für Modell IIa):

$$b) \quad d(E_1 + U)/dt = k_{B,E} \cdot B = (k_{B,E_1} + k_{B,U}) \cdot B \quad (Gl. 19)$$

$$c) \quad dE_1/dt = k_{B,E_1} \cdot B \quad (Gl. 20)$$

sowie

$$d) \quad dU/dt = k_{B,U} \cdot B \quad (Gl. 21)$$

Durch die genannte Aufspaltung lassen sich die experimentellen Werte "fitten" (siehe Abb. 23). Hierbei wird deutlich, daß nach i.v.-Gabe die Ausscheidung mit dem Urin nur etwa ein Fünftel der Gesamtelimination ausmacht⁺. Die Ausscheidung des Arzneistoffs in unveränderter Form mit dem Urin ist demnach für die Elimination des Tridihexethyls von untergeordneter Bedeutung. Vergleichbare Ergebnisse werden für andere quartären Ammoniumverbindungen beschrieben (37, 62, 120).

Tab. 9 : Renale Ausscheidung von Tridihexethylethylsulfonat sowie -decylsulfonat beim Hund (in % der applizierten Dosis)

Salz	Versuch	Hund	Appl.form	%ausgesch.	
				2 Std.	4 Std.
Decylsulfonat	1	I	i.v.	8,6	9,3
Ethylsulfonat	2	II	i.v.	8,1	9,4
Decylsulfonat	3	I	peroral	1,2	1,7
Ethylsulfonat	4	II	peroral	1,1	1,4

⁺ Gesamtradioaktivitätsmessungen zeigen, daß auch das Tridihexethylchlorid beim Hund nach i.v.-Applikation hauptsächlich in Faeces erscheint (Pers.Mitteilung, Dr.R.Kelly, Cyanamid, Pearl River, USA).

Die in Tab. 9 angegebenen Werte zeigen, daß zumindest in den ersten 4 Stunden keine nennenswerte Unterschiede in der Urinausscheidung der einzelnen Homologen sowohl nach peroraler wie auch nach i.v.-Applikation vorhanden sind. Aus Tab. 10 und 11 ist ersichtlich, daß sich die beiden Tridihexethylsalze weder in ihrem Verteilungs- noch in ihrem Eliminationsverhalten unterscheiden. Dies gilt bei i.v. - auch für die Mikro-Geschwindigkeitskonstanten $k_{B,U}$ und k_{B,E_1} , die von $k_{B,E}$ entsprechend Modell II erhalten werden.

5.3 Modifizierung des Zweikompartimentmodells bei peroraler Applikation

5.3.1 Verringerte Bioverfügbarkeit

Beim Versuch, den erhaltenen experimentellen Daten Kurvenverläufe nach peroraler Applikation entsprechend Modell IIa am Analogrechner anzupassen, ergeben sich Schwierigkeiten: Bei Zugrundelegung der gegebenen Dosis D als biologisch verfügbare Menge an Arzneistoff im Gastrointestinaltrakt G ist ein "Fitten" der experimentellen Daten nicht zu erreichen. Die Arzneistoffmenge im Gastrointestinaltrakt ist zu groß. Dies läßt darauf schließen, daß ein beträchtlicher Teil der peroral gegebenen Dosis nicht bioverfügbar ist. Entsprechendes Verhalten kann auch bei anderen quartären Ammoniumverbindungen nachgewiesen werden (1, 63, 64). Modell IIa reicht demnach nicht aus, um die experimentellen Werte zu erklären. Es wird damit eine Erweiterung des Zweikompartimentmodells notwendig, wobei folgende Varianten denkbar sind:

a) Der Arzneistoff wird nur unvollständig resorbiert. Es

tritt eine umfangreiche, irreversible Bindung des Arzneistoffkations an der Oberfläche der Mucosa der Intestinalwand auf, so daß die Homologen nicht mehr zur Resorption verfügbar sind.

- b) Auf den Arzneistoff wirkt sich der "first-pass"-Effekt (Effekt der ersten Leberpassage) aus. Das könnte bedeuten:

Nur ein Teil an Arzneistoff erreicht das zentrale Kompartiment unverändert (Metabolisierung in der Leber) oder ein Teil des Arzneistoffs verläßt zwar den Gastrointestinaltrakt, erreicht aber nicht das zentrale Kompartiment (biliäre Ausscheidung des Arzneistoffs und/oder seiner Metaboliten).

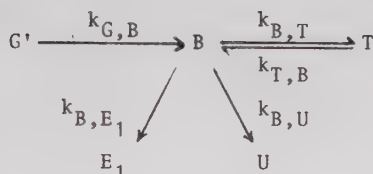
Beide Varianten werden hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf die experimentellen Werte überprüft, indem die Kurvenverläufe am Analogrechner simuliert werden (siehe exptl.-Teil).

5.3.2 Unterschiedliches Resorptionsverhalten der Salze unter der Annahme einer Bindung an die Mucosa

Verschiedene Autoren beschreiben eine starke Adsorption quartärer Ammoniumverbindungen an die Mucosa der Darmwand (14, 62, 65, 84, 94, 65, 108). Entsprechendes Verhalten ist auch für die Tridihexethylsalze denkbar . Unter dieser Annahme läßt sich folgendes biologische Modell ⁺ aufstellen:

⁺ Andere Autoren (113) fanden beim Tridihexethylchlorid, daß die dort erhaltenen experimentellen In-vivo-Daten durch ein Dreikompartimentmodell zu beschreiben sind. Im vorliegenden Fall aber lassen sich die Werte ausreichend mit Modell III beschreiben.

Modell III



Die großen Buchstaben bezeichnen hierbei wieder die Arzneistoffmengen in den einzelnen Verteilungsräumen: G' = resorbierbarer Arzneistoff im Gastrointestinaltrakt. $G'_0 = f \cdot D$ (f zwischen 0 und 1). G'_0 ist die bei $t = 0$ nach irreversibler Adsorption eines Teils der quartären Ammoniumverbindung noch zur Resorption verfügbare Menge der peroral gegebenen Dosis D , $1-f$ = gebundener Anteil), B bezeichnet wieder die Arzneistoffmenge im zentralen, T die im tieferen Kompartiment, U den unveränderten Arzneistoff im Urin und E_1 anderweitig eliminierten Arzneistoff. $k_{G,B}$, $k_{B,T}$, $k_{T,B}$, $k_{B,U}$ sowie k_{B,E_1} bezeichnen die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten. Unter Zugrundelegung von Modell III und unter Heranziehung der durch "Abschälen" näherungsweise bestimmten Geschwindigkeitskonstanten lassen sich den experimentellen Daten nach peroraler Applikation am Analogrechner Kurvenverläufe anpassen, sowie die Fraktion f an resorbierbarem Arzneistoff bestimmen.

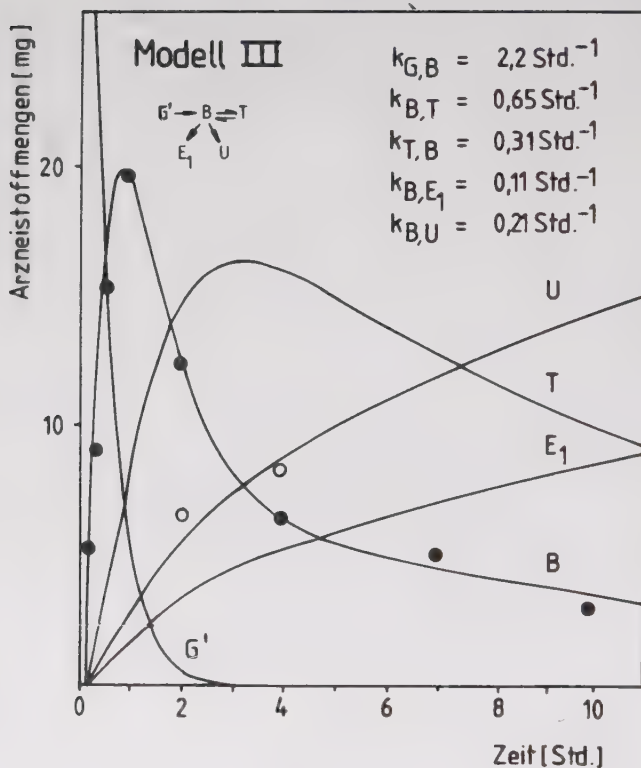


Abb. 24 : Beispiel für einen Analogrechnerfit:

Verteilung von Tridihexethylethylsulfonat in den
Kompartimenten G', B, T, U und E₁ nach peroraler
Applikation

Hund II, Versuch 4; Punkte experimentelle Werte;
Kurven: am Analogrechner "gefittet"; applizierte
Dosis: 600 mg;

Die für die einzelnen Versuche nach i.v. und peroraler Applikation ermittelten pharmakokinetischen Parameter (entsprechend Modell II (i.v.-Applikation) und Modell III (peroraler Applikation) sind in Tab. 10 und 11 aufgeführt. Da E_1 und U außer bei Versuch 1 bis 4 (Tab. 10 u. 11) zu E (insgesamt eliminiertes Arzneistoff) zusammengefaßt sind, resultiert dabei die entsprechende Geschwindigkeitskonstante $k_{B,E}$.

Nach peroraler Applikation der Homologen zeigt sich bei beiden Salzen ein außerordentlich steiler Anstieg der Konzentration im Plasma mit einem Maximum nach etwa einer 3/4 Stunde und ein steiler Abfall bis ca. 3 Stunden (Abb. 24) infolge schneller Resorption und schneller sowie umfangreicher Verteilung des Arzneistoffs in das Kompartiment T. Die Mikrokonstanten liegen alle im Bereich von etwa 0,2 bis 0,8 Std⁻¹, nur die Resorptionsgeschwindigkeitskonstanten ⁺ sind höher (ca. 2 bis 3,5 Std⁻¹).

Eine Entscheidung über unterschiedliches Resorptionsverhalten der homologen Salze setzt einen kritischen Vergleich aller pharmakokinetischer Parameter aus Tab. 10 u. 11 voraus. Schwierigkeiten bereitet dabei allerdings die Tatsache, daß die Zahl der Versuche statistisch abgesicherte Aussagen nicht zuläßt. Alle Gegenüberstellungen müssen daher unter Berücksichtigung der starken Streuung bei biologischen Versuchen vorgenommen werden. Im einzelnen ergibt sich dabei:

⁺ Die Resorption wird nach 8 Stunden abgeschaltet. Außerdem erweist sich die Einstellung einer Induktionszeit von 8 Minuten als notwendig (siehe exptl. Teil).

- a) Vergleich pharmakokinetischer Parameter bei gleicher Applikation an verschiedenen Versuchstieren (Vergleich von Hund zu Hund). Hierbei sind keine systematischen Abweichungen erkennbar. Dadurch wird keine Unterscheidung der Konstanten zwischen den Hunden notwendig, da alle Werte übliche biologische Streuung aufweisen.
- b) Vergleich pharmakokinetischer Parameter der Verteilung und Elimination nach i.v.- und peroraler Applikation:
Die die Gesamtelimination beschreibende Hybridgeschwindigkeitskonstante β und die zugehörigen Halbwertszeiten für die einzelnen Versuche weisen erwartungsgemäß keine Unterschiede zwischen i.v.- und peroraler Applikation auf. Auch liegen die Verteilungsparameter $k_{B,T}$ und $k_{T,B}$ innerhalb der üblichen biologischen Schwankungen zwischen den Versuchen. Die Mikrogeschwindigkeitskonstante $k_{B,E}$ zeigt zwar die größte Streuung aller Geschwindigkeitskonstanten, deutet aber ebenfalls auf Gleichartigkeit der Vorgänge bei unterschiedlicher Applikationsart hin.
Lediglich bei einer Aufspaltung der Eliminationsgeschwindigkeitskonstante $k_{B,E}$ scheinen sich Unterschiede zu ergeben: Die $k_{B,U}$ - Werte liegen nach peroraler Applikation höher, die k_{B,E_1} - Werte entsprechend niedriger.
Die geringen Unterschiede der pharmakokinetischen Parameter der Verteilung und Elimination zeigen, daß die Applikationsart keinen Einfluß auf die entsprechenden Teilverläufe hat.
- c) Vergleich aller pharmakokinetischen Parameter hinsichtlich abnehmender bzw. zunehmender Tendenzen im Laufe der

Versuchswiederholungen:

Bei allen pharmakokinetischen Parametern sind eindeutige Tendenzen nicht erkennbar. Damit bleiben sie von Wiederholungen der Versuche unbeeinflusst.

d) Vergleich der Resorptionsparameter:

Die Resorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{G,B}$ sind beim lipophileren Decylhomologen i.a. größer als beim Ethylsalz. Dies weist auf eine schnellere Resorption des Tridihexethyldecylsulfonates im Vergleich zum Ethylhomologen hin. Dementsprechend liegen die Zeiten bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration, t_{max} , beim Ethylsalz höher. Übereinstimmend damit sind hier die maximalen Plasmakonzentrationen b_{max} , etwas niedriger als beim lipophileren Salz. Dies wirkt sich allerdings nur geringfügig auf das Ausmaß der Bioverfügbarkeit aus (Tab. 10 u. 11). Die absolute Bioverfügbarkeit des Tridihexethylethylsulfonats liegt im Mittel bei 8 bzw. 11%, die des Decylsulfonatsalzes bei 9 bzw. 12%. Im Vergleich zur Maus (relative Bioverfügbarkeit des Decylsulfonatsalzes um 80% höher als beim Ethylsulfonat) ist beim Hund nur um etwa 10% besser bioverfügbar. Variation der Resorption-Mikrokonstanten durch entsprechende Simulierung am Analogrechner zeigt jedoch, daß sich die Unterschiede in den Resorptionsgeschwindigkeitskonstanten bei den beiden Extremfällen (Versuch 11 und 12) mit nur 6% auf die Fläche unter der Blutspiegel-Zeitkurve auswirken. Bei $k_{B,T}$ und $k_{T,B}$ beträgt der Unterschied in den Extremen sogar nur 3%. Eine Variation von $k_{B,E}$ allerdings macht im Extremfall

(Versuch 8 und 12) einen Unterschied von ca. 74% in der Fläche aus! Unterschiede in den Flächen werden auf Grund der Größenverhältnisse der Mikrokonstanten damit hauptsächlich durch die Unterschiede in $k_{B,E}$ und weniger durch die von $k_{G,B}$ bestimmt.

Insgesamt darf jedoch nicht außer acht gelassen werden, daß die absolute Bioverfügbarkeit für beide Salze trotz rascher Resorption gering ist. Wenn jedoch die Unvollständigkeit der enteralen Resorption durch eine Bindung der Arzneistoffkationen an die Mucine zustande kommt, so dürften sich im Ausmaß der Sorption der beiden Homologen kaum Unterschiede zeigen, da der Einfluß von Gegenionen auf die Bindung an die Mucosa zu vernachlässigen ist (89).

Ein Unterschied in der Bioverfügbarkeit der Salze kann daher nur durch unterschiedliche Resorption des an sich kleinen Anteils an Arzneisubstanz, der zur Resorption zur Verfügung steht, hervorgerufen werden. Durch das große Ausmaß der Bindung werden diese Unterschiede leicht verdeckt.

Tab. 10 : Pharmakokinetische Parameter von Tridihexethylethylsulfonat
am Hund entsprechend Modell II bzw. III;
i.v.-Applikation: 5 mg/kg, perorale Applikation: 20 mg/kg

Versuchsanordnung			Verteilungs- u. Eliminations- parameter				Resorptionsparameter					
Versuch	Hund	Appl.	$k_{T,B}$ Std^{-1}	$k_{B,T}$ Std^{-1}	$k_{B,E}^+$ Std^{-1}	k_{el} Std^{-1}	$t_{1/2el}$ Std	$k_{G,B}$ Std^{-1}	$t_{\max}$ Std	$b_{\max}$ $\mu\text{g/ml}$	f	f_F
2	II	i.v.	0,22	0,79	0,68	0,09	7,7	-	-	-	-	-
4	II	peros	0,31	0,65	0,32	0,08	8,7	2,2	0,85	0,15	0,07	0,13
6	II	i.v.	0,29	0,78	0,47	0,09	7,7	-	-	-	-	-
7	I	peros	0,22	0,70	0,53	0,09	7,7	2,2	0,8	0,24	0,11	0,11
9	I	i.v.	0,31	0,65	0,51	0,12	5,8	-	-	-	-	-
11	I	peros	0,35	0,55	0,46	0,13	5,3	1,9	0,8	0,14	0,07	0,08

+ $k_{B,E}$ kann bei Versuch 2 und 4 aufgespalten werden in :

Versuch 2 : $k_{B,U} = 0,14 \text{ Std}^{-1}$; $k_{B,E_1} = 0,54 \text{ Std}^{-1}$ (i.v. Injektion)

Versuch 4 : $k_{B,U} = 0,21 \text{ Std}^{-1}$; $k_{B,E_1} = 0,11 \text{ Std}^{-1}$ (perorale Applikation)

Tab. 11 : Pharmakokinetische Parameter von Tridihexethyldecylsulfonat
am Hund entsprechend Modell II bzw. III;
i.v.-Applikation: 6,5 mg/kg, perorale Applikation: 26 mg/kg

Versuchsanzordnung			Verteilungs- u. Eliminationsparameter					Resorptionsparameter				
Versuch	Hund	Appl.	$k_{T,B}$ Std ⁻¹	$k_{B,T}$ Std ⁻¹	k_{B,E_1} Std ⁻¹	k_{el} Std ⁻¹	$t_{1/2el}$ Std	$k_{G,B}$ Std ⁻¹	t_{max} Std	b_{max} µg/ml	f	f_F
1	I	i. v.	0,17	0,76	0,68	0,08	8,7	-	-	-	-	-
3	I	peros	0,31	0,63	0,40	0,10	6,9	2,7	0,7	0,17	0,09	0,14
5	I	i. v.	0,24	0,65	0,61	0,10	6,9	-	-	-	-	-
8	II	peros	0,28	0,55	0,58	0,13	5,3	2,1	0,75	0,23	0,10	0,11
10	II	i. v.	0,27	0,65	0,48	0,10	6,9	-	-	-	-	-
12	II	peros	0,33	0,65	0,31	0,08	8,7	3,6	0,65	0,18	0,09	0,12

+ $k_{B,E}$ kann bei Versuch 1 und 3 aufgespalten werden in :

Versuch 1 : $k_{B,U} = 0,15 \text{ Std}^{-1}$; $k_{B,E_1} = 0,53 \text{ Std}^{-1}$ (i.v.-Injektion)

Versuch 3 : $k_{B,U} = 0,19 \text{ Std}^{-1}$; $k_{B,E_1} = 0,21 \text{ Std}^{-1}$ (perorale Applikation)

Symbole für Tab. 10 und 11 :

- k_{el} = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
(= Hybridkonstante β)
- $t_{1/2el}$ = Eliminationshalbwertszeit nach Einstellung
der Verteilung
- t_{max} = Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration
- b_{max} = Maximale Plasmakonzentration, bezogen auf das
Arzneistoffkation
- f = absolute Bioverfügbarkeit ⁺ nach peroraler Appli-
kation bezogen auf die gegebene Gesamtdosis
- f_F = absolute Bioverfügbarkeit ⁺ nach peroraler Appli-
kation bezogen auf die i.v.-Injektion (bestimmt
nach dem Prinzip der korrespondierenden Flächen
(20) nach Dost)

⁺ Die absolute Bioverfügbarkeit bezeichnet das Verhältnis aus der resorbierten Arzneistoffmenge zur gegebenen Dosis bzw. zur verfügbaren Menge nach i.v.-Injektion. Multipliziert mit 100 ergeben sich Prozentangaben (68a).

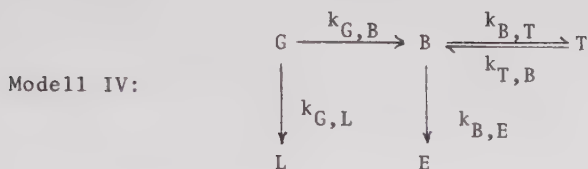
5.3.3 Unterschiedliches Resorptionsverhalten unter der Annahme eines "first pass" - Effektes

Neben einer Bindung des Tridihexethylkations an Mucine des Gastrointestinaltraktes ist zur Erklärung des kleinen Ausmaßes der Bioverfügbarkeit an einen starken "first-pass"-Effekt zu denken. So wird auch von verschiedenen Autoren bei Untersuchungen zur Resorption anderer quartärer Ammoniumverbindungen die Möglichkeit eines "first pass"- Effekts diskutiert (40, 94). Dabei könnte der Effekt der ersten Leberpassage sowohl bedeuten, daß nur ein Teil des Arzneistoffs das zentrale Kompartiment unverändert erreicht (Metabolisierung in der Leber), wie auch, daß zwar die Arzneisubstanz den Gastro-Intestinaltrakt verläßt, ein Teil aber nicht das zentrale Kompartiment erreicht (biliäre Ausscheidung des Arzneistoffs und/oder seiner Metaboliten).

Für die Annahme eines Effektes der ersten Leberpassage sprechen experimentelle Befunde mit anderen quartären Ammoniumverbindungen. So werden z.B. einige von ihnen in großen Mengen in der Galle gefunden (40, 63, 94, 106). Andere quartäre Arzneistoffe dagegen scheinen diesem Eliminationsweg nicht zu unterliegen (27, 61, 81, 83). Bei biliärer Exkretion ist allerdings eine Unterscheidung zwischen den unveränderten Verbindungen und ihren Metaboliten oder Konjugaten mit großen Schwierigkeiten verbunden (3).

Ohne im vorliegenden Fall zwischen Metabolisierung während der ersten Leberpassage und/oder Ausscheidung in die Galle zu diffe-

renzieren, können diese Vorgänge als paralleler Weg zur Resorption angesehen werden, so daß folgendes biologische Modell resultiert:



Neben den bereits in den vorhergehenden Modellen bezeichneten Parametern beschreibt L hierbei den Anteil der peroralen applizierten Dosis D, der bei der ersten Leberpassage biliär ausgeschieden und nicht rückresorbiert oder metabolisiert wird. Dieser Teil der Dosis verläßt parallel zum bioverfügbaren Arzneistoff mit der Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung $k_{G,L}$ den Gastrointestinaltrakt. Damit gilt zusätzlich folgende Differentialgleichung (vergl. IV. 5.2):

$$dL/dt = k_{G,L} \cdot G \quad (Gl. 22)$$

Gl. 17 wird zu

$$-dG/dt = (k_{G,B} + k_{G,L}) \cdot G \quad (Gl. 23)$$

Unter Zugrundelegung der jeweiligen Dosen D und der experimentellen Plasmakonzentrationen am Analogrechner simulierten pharmakokinetischen Abläufe (Abb. 25) ergeben sich Geschwindigkeitskonstanten, die von denen des vorhergehenden Modells unterschiedlich sind (Tab. 12 und 13).

Hierbei zeigt sich vor allem bei der Resorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{G,B}$ eine deutliche Verringerung gegenüber Modell III.

Die unterschiedlichen Resorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{G,B}$ bei Modell III (Bindung) und IV ("first pass") kommen dadurch zustande, daß bei ersterem die Menge an Arzneistoff in G nicht der gegebenen Dosis D entspricht, sondern nur $f'G$ ($= f'D$). Bei dem vorliegenden Modell wird dagegen die gegebene Dosis D eingesetzt ⁺.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Verteilung und Elimination nehmen gegenüber Modell III nur geringfügig ab. Zwischen dem Ethyl- und Decylsulfonatsalz scheint allerdings hinsichtlich seiner Resorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{G,B}$ kein Unterschied mehr zu bestehen. Die für den "first pass"-Effekt verantwortlichen Mikrokonstanten $k_{G,L}$ liegen dagegen beim Decylhomologen höher als beim Ethylsalz, d.h., hier macht sich der Einfluß der Gegenionen deutlich bemerkbar. Bei den weiteren Resorptionsparametern t_{max} , b_{max} sowie f_F weisen lediglich die f_F - Werte auf ein größeres Ausmaß der Bioverfügbarkeit des Decylsulfonatsalzes hin (im Mittel 13% gegenüber 11% beim Ethylsulfonatsalz) ⁺⁺.

Die in Tab. 12 und 13 angeführten Ergebnisse zeigen, daß sich die beiden Homologen unter Annahme des Modells IV weniger in der Resorption des unveränderten Arzneistoffs, sondern stärker

⁺ Auf die Tatsache, daß bei Vorgängen, die zur Resorption parallel ablaufen, sich die Resorptionsgeschwindigkeitskonstante verringert, weisen auch andere Autoren hin (59, 91, 95).

⁺⁺ Die zur Bestimmung der f_F -Werte notwendigen korrespondierenden Flächen nach i.v.-Injektion werden für die entsprechenden Versuche aus Tab. 10 und 11 entnommen.

in ihrem "first pass" - Verhalten unterscheiden. Auch diese Befunde sind aber mit unterschiedlicher Lipophilie erklärbar, wie an undissoziierten Substanzen bereits beschrieben (101).

Tab. 12 : Pharmakokinetische Parameter von Tridihexethylsulfonat
nach peroraler Applikation am Hund entsprechend Modell IV;
Dosis: 20 mg/kg

Versuchsanordnung			Verteilungs- u. Eliminations- parameter					Resorptionsparameter				
Versuch	Hund	Appl.	$k_{T,B}$ Std ⁻¹	$k_{B,T}$ Std ⁻¹	$k_{B,E}$ Std ⁻¹	k_{el} Std ⁻¹	$t_{1/2el}$ Std	$k_{G,B}$ Std ⁻¹	t_{max} Std	b_{max} µg/ml	$k_{G,L}$ Std ⁻¹	f_F
4	II	per os	0,25	0,62	0,22	0,06	11,6	0,56	0,55	0,22	8,5	0,13
7	I	per os	0,19	0,65	0,49	0,07	9,9	0,90	0,6	0,31	7,1	0,12
11	I	per os	0,34	0,52	0,45	0,13	5,3	0,61	0,5	0,18	8,4	0,09

Symbole: k_{el} = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante (= Hybridkonstante β)

$t_{1/2el}$ = Eliminationshalbwertszeit nach Einstellung der Verteilung

t_{max} = Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration

b_{max} = Maximale Plasmakonzentration, bezogen auf das Arzneistoffkation

f_F = absolute Bioverfügbarkeit nach peroraler Applikation,
bezogen auf die i.v.-Injektion (Modell III, Tab. 10 und 11)

Tab. 13 : Pharmakokinetische Parameter von Tridihexethyldecylsulfonat
nach peroraler Applikation am Hund entsprechend Modell IV;
Dosis: 26 mg/kg

Versuchsanordnung			Verteilungs- u. Eliminations- parameter					Resorptionsparameter				
Versuch	Hund	Appl.	$k_{T,B}$ Std^{-1}	$k_{B,T}$ Std^{-1}	$k_{B,E}$ Std^{-1}	k_{el} Std^{-1}	$t_{1/2el}$ Std	$k_{G,B}$ Std^{-1}	$t_{\max}$ Std	$b_{\max}$ $\mu\text{g/ml}$	$k_{G,L}$ Std^{-1}	f_F
3	I	peros	0,28	0,56	0,39	0,10	6,9	0,82	0,7	0,23	9,2	0,15
8	II	peros	0,20	0,41	0,30	0,07	9,9	0,51	0,5	0,20	9,4	0,11
12	II	peros	0,28	0,56	0,29	0,08	8,7	0,69	0,6	0,27	9,2	0,13

Symbole wie Tab. 12

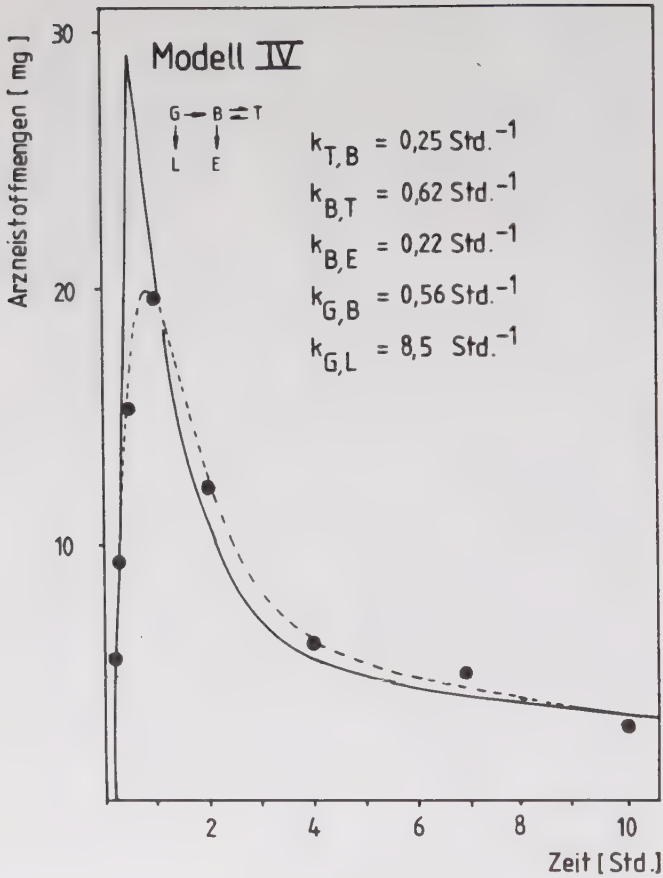


Abb. 25 : Beispiel für einen Analogrechnerfit:

Verteilung von Tridihexethylethylsulfonat im zentralen Kompartiment B nach peroraler Applikation Hund II, Versuch 4; Punkte: experimentelle Werte; Kurven: am Analogrechner "gefittet"; applizierte Dosis: 600 mg; Zum Vergleich ist die bei Modell III erhaltene Kurve gestrichelt mit eingezeichnet;

5.3.4 Vergleich der Modelle mit Arzneistoffbindung und "first pass"-Effekt

Die Simulierung der Modelle III und IV am Analogrechner zeigt, daß beide etwa gleich gute "fits" der experimentellen Daten ermöglichen. Damit ist keine eindeutige Zuordnung zu einem biologischen Modell möglich, sie erweisen sich als kinetisch äquivalent. Es ist auch denkbar, daß es in vivo zu einer Überlagerung der für die Verringerung der Bioverfügbarkeit verantwortlichen Prozesse kommt. Dies würde bedeuten, daß die den beiden Modellen zu Grunde liegenden Bedingungen (Bindung an die Mucosa und "first pass"-Effekt) gleichzeitig verwirklicht sind. In beiden Fällen unterscheidet sich dabei das lipophilere Tridihexethyldecyl- vom -ethylsulfonat: Es verläßt den Gastro-Intestinaltrakt des Hundes schneller.

6. Zusammenfassung von Gesetzmäßigkeiten der Resorption

Die Ergebnisse aus den pharmakokinetischen Untersuchungen am Hund zeigen, daß die homologen Sulfonatsalze des quartären Tridihexethyls aus dem Gastrointestinaltrakt schnell resorbiert werden. Dieser Befund wird durch die Beobachtung des Wirkungseintritts bei der peroralen Applikation wäßriger Tridihexethylsalze bei der Maus bestätigt. Auch die Resorption aus dem Peritoneum der Maus erfolgt rasch.

Hinsichtlich des Einflusses der Gegenionen ergibt sich folgendes: Nach intraperitonealer Injektion nimmt mit zunehmender Kettenlänge der Gegenionen die Toxizität zu, was auf eine

größere Bioverfügbarkeitsgeschwindigkeit schließen läßt.

Übereinstimmend hiermit besteht bei den entsprechenden Zeiten bis zum Eintritt der Letalität (LT) die Tendenz zur Abnahme.

Eine verbesserte Resorption des Tridihexethyldecylsulfonats gegenüber dem hydrophileren Ethylhomologen wird auch bei der Maus gefunden, wie die signifikant größere renale Ausscheidungsrate zeigt. Wenn auch diese beim Hund nicht nachgewiesen werden kann, so läßt sich doch an 2 verschiedenen Modellen (Arzneistoffbindung, "first pass" - Effekt) für das lipophile Salz eine etwas bessere Bioverfügbarkeit annehmen: Das Decylsulfonatsalz verläßt den Gastro-Intestinaltrakt des Hundes mit größerer Geschwindigkeit und größerem Ausmaß.

Die unterschiedliche Lipophilie der Gegenionen wirkt sich nur auf Resorptions- bzw. Diffusionsprozesse aus. Das beweisen Untersuchungen am isolierten Organ (Jejunum der Ratte), bei denen keine Wirkungsunterschiede gefunden werden können. Darüber hinaus bleiben auch Verteilungsvorgänge, die der Resorption nachgeschaltet sind, unbeeinflusst.

Die von der Lipophilie der Gegenionen abhängige Resorption quartärer Ammoniumverbindungen bestätigt Vorstellungen Higuchis zur Resorption dissoziierter Verbindungen als Ionenpaare (48). Danach kann die Lipophilie und damit die Resorption nicht nur durch Substitution am Arzneistoff selbst, sondern auch durch Gegenionen beeinflusst werden. Andere Autoren fanden, daß die Resorption quartärer Verbindungen verbessert werden kann, indem die Konzentration lipophiler Gegenionen erhöht wurde (127), was ebenfalls die Hypothese der Ionenpaarresorption unterstützt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß auch bei äquimolaren Verhältnissen lipophile Ionenpaare gebildet werden, die die Resorption beeinflussen.

Ein Vergleich der In-vivo-Befunde mit den Ergebnissen der Untersuchungen der Membrandiffusion zeigt, daß durch Erhöhung der Lipophilie der Salze die Membranpassage durch lipophile Barrieren bis zu einem Grenzwert wesentlich verbessert wird und daß sich dies auch in vivo auf das Resorptionsverhalten auswirkt. Die Erhöhung der Bioverfügbarkeit ist allerdings komplexer und zum Teil weniger stark ausgeprägt als bei den In-vitro Untersuchungen. Bei der Maus tritt der Einfluß der Gegenionen auf die Resorption klar hervor. Auch deutet sich hier ein asymptotischer Verlauf an. Die pharmakokinetischen Untersuchungen am Hund lassen dagegen den Einfluß der Gegenionen weniger deutlich erkennen.

Insgesamt zeigt sich, daß lipophile Gegenionen dissoziierter Arzneistoffe für die Resorption von Bedeutung sind. Die gleichzeitige Applikation kationisch und anionisch dissoziierter Arzneistoffe (wie z.B. quartäre Ammoniumverbindungen und Substanzen wie Benzoessäuresulfimid oder Metamizol) können dadurch zu unerwarteten Arzneistoffinteraktionen Anlaß geben.

V. EXPERIMENTELLER TEIL UND AUSWERTUNGEN

1. Herstellung der Tridihexethylsalze

Aus Tridihexethylchlorid (Lederle, München) werden durch Ionenpaarausschüttelungen (76) mit Na-n-Butylsulfat, Na-n-Octylsulfat, Na-n-Decylsulfat, Na-n-Decylsulfonat (Henkel, Düsseldorf), Na-n-Hexansulfonat (Eastman-Kodak, Rochester, USA), Na-n-Butansulfonat, Na-n-Dodecansulfonat, Na-capronat (Merck, Darmstadt), Ethansulfonsäure, Na-n-Octansulfonat, Na-n-Butyrat, Na-n-Caprylat, Caprinsäure (Schuchardt, München) direkt bzw. nach Zugabe äquimolarer Mengen NaOH die entsprechenden Tridihexethylsulfonate, -sulfate und -carboxylate ⁺ hergestellt. Entsprechend wird bei der Herstellung von Tridihexethylsalzen des Metamizols sowie des o-Benzoesäuresulfimids verfahren (Metamizol-Na, Hoechst, Frankfurt; o-Benzoesäuresulfimid-Na, Caesar u. Loretz, Hilden). Im einzelnen werden jeweils 5×10^{-3} Mol Tridihexethylchlorid zusammen mit den Salzen der entsprechenden Gegenionen in 50 ml Wasser gelöst und mit 150 ml Chloroform 24 Std. geschüttelt. Nach Entmischung wird die Chloroformphase abgetrennt und im Rotationsverdampfer und anschließend im Vakuumtrockenschrank bei 50°C bis zur Trockene eingeengt. Der Gehalt nach spektralphotometrischer Bestimmung liegt bei 98-100%. Schmelzpunkte sind in Tab. 1, CHN-Analysen in Tab. 14 angegeben. Verunreinigungen durch Na⁺ bzw. Cl⁻ kann nicht nachgewiesen werden⁺⁺. Die Werte der CHN-Analysen liegen innerhalb der üblichen Grenzen.

⁺ Ausschüttelung der Carboxylate erfolgt bei pH = 7,4, Pufferpuffer, Ionenstärke $\mu = 0,1$

⁺⁺ durch Na-Flamme bzw. AgCl-Niederschlag

Tab. 14 : C,H,N-Analysen der Tridihexethylsalze

Anion	Soll %			gefunden %		
	C	H	N	C	H	N
$C_4H_9OSO_3^-$	63,7	9,6	2,9	63,8	8,6	2,97
$C_8H_{17}OSO_3^-$	66,0	10,1	2,6	66,1	8,9	2,63
$C_{10}H_{21}OSO_3^-$	67,1	10,4	2,5	67,2	9,3	2,53
$C_4H_9SO_3^-$	65,9	9,9	3,1	64,2	8,7	2,99
$C_6H_{13}SO_3^-$	67,0	10,2	2,9	66,8	9,2	2,88
$C_8H_{17}SO_3^-$	68,0	10,4	2,7	67,9	9,1	2,75
$C_{10}H_{21}SO_3^-$	69,0	10,6	2,6	68,5	9,4	2,51
$C_{12}H_{25}SO_3^-$	69,9	10,8	2,5	69,8	9,4	2,40
$C_3H_7COO^-$	74	10,7	3,5	72,7	10,9	3,38
$C_5H_{11}COO^-$	74,8	10,9	3,2	73,5	11,0	3,02
$C_7H_{15}COO^-$	75,4	11,1	3,0	74,4	11,1	2,96
$C_9H_{19}COO^-$	76,0	11,3	2,9	74,6	11,3	2,83
$C_{13}H_{16}N_3SO_4^-$	64,9	8,3	8,9	63,5	8,4	8,71
$C_7H_4NO_3S^-$	67,2	8,1	5,6	66,7	8,2	5,41
Cl^-	71,3	10,3	3,9	71,2	10,5	3,81

2. Schmelzpunkte und Löslichkeiten

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit der Schmelzpunktapparatur nach Tottoli (Büchi, Flouvil, Schweiz).

Zur Ermittlung der Sättigungskonzentrationen werden 5 ml frisch destilliertes Wasser bzw. n-Octanol (E.Merck, Darmstadt; mit Molekularsieb 4 Å, Perlform 2 mm getrocknet) mit einer aus-

reichenden Menge der Substanzen versetzt und 3 Tage geschüttelt ($20 \pm 1^\circ\text{C}$). Die überstehende Flüssigkeit wird zentrifugiert; anschließend Konzentrationsbestimmung (UV-Spektralphotometer DMR 10, Zeiss, Oberkochen, $\lambda_{\text{max}} = 257 \text{ nm}$).

3. Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung (σ) wäßriger Tridihexethyl-n-alkylsulfate, n-alkylsulfonate und -carboxylate wird mit dem Interfacialtensiometer nach Lecomte Du Noüy (A. Krüss, Hamburg) ermittelt.

4. Dissoziationskonstanten

Die Dissoziationskonstanten werden aus Leitfähigkeitsmessungen bestimmt. Die Messungen der Leitwerte erfolgen mit dem Konduktoskop Metrohm E 365 B und der Elektrode EA 608 (Metrohm AG, Herisau, Schweiz) bei $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Konzentration: $2 \cdot 10^{-3}$ bis $1,25 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l}$. Dabei werden die Eigenleitwerte von Wasser bzw. wassergesättigtem n-Octanol berücksichtigt. Die Auswertung erfolgt nach dem Ostwaldschen Verdünnungsgesetz (8, 72). Bei Auftragung von $1/\lambda$ gegen $c \cdot \lambda$ ergibt sich in guter Näherung eine Gerade mit dem Achsenabschnitt $1/\lambda_\infty$ und der Steigung $\frac{1}{K(\lambda_\infty)^2}$. Daraus kann die Ionenpaardissoziationskonstante K bestimmt werden (Abb. 26).

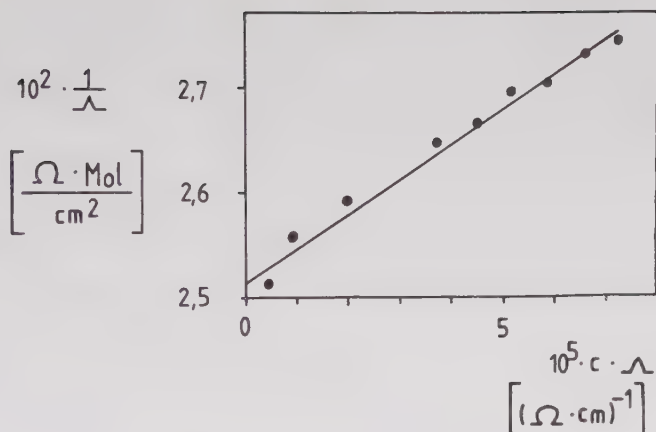


Abb. 26 : Bestimmung der Ionenpaardissoziationskonstanten am
Beispiel des Tridihexethyl-octylsulfonats
Temp. $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$

5. Verteilungskoeffizienten

Zur Ermittlung der experimentellen Verteilungskoeffizienten zwischen Wasser und n-Octanol werden frisch destilliertes Wasser ⁺ und wassergesättigtes n-Octanol (20:20 ml) ⁺⁺ eingesetzt. Zur Verteilung werden die Mischungen 24 Std. in 100 ml

⁺ Auf Sättigung der wäßrigen Phasen mit n-Octanol wird wegen der geringen Löslichkeit von 0,06 Gew. % n-Octanol in Wasser (107) verzichtet. Bei den Carboxylaten wird als wäßrige Phase Phosphatpuffer, pH = 7,4, Ionenstärke $\mu = 0,1$ verwendet.

⁺⁺ Der experimentelle Verteilungskoeffizient von Tridihexethylchlorid wird mit und ohne Zusatz von 0,1 N NaCl und unter Änderung der Volumensverhältnisse auf 1 : 100 bestimmt.

Steilbrustflaschen geschüttelt (Temp. $20^{+1}0^{\circ}\text{C}$), Ausgangskonzentrationen $2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l bzw. $1,5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l je nach Löslichkeit; jeweils 3 Ansätze). Zur besseren Phasentrennung bleiben die Mischungen 24 Stunden stehen; anschließend wird die n-Octanolphase dekantiert und 20 min. bei 3000 U/min. zentrifugiert (Junior Tischzentrifuge, Christ, Osterode). Die Gehaltsbestimmung erfolgt UV-spektralphotometrisch in der n-Octanolphase, bei sehr geringen Konzentrationen zusätzlich in der Wasserphase. Ansonsten errechnet sich die Konzentration in Wasser als Differenz zur Ausgangskonzentration. Die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes wird vorher bestätigt.

6. Relative Diffusionswerte

25 ml der jeweiligen Lösungen in n-Octanol (Konzentration: $2,0 \cdot 10^{-3}$ Mol/l ⁺) werden in eine Diffusionsapparatur nach Mørch (12, 74) eingebracht und mit 10 ml wassergesättigten n-Octanol übschichtet. Nach 72 Stunden wird in dieser Flüssigkeitsschicht die Konzentration an diffundiertem Arzneistoff bestimmt. Der relative Diffusionswert ⁺⁺ errechnet sich als Quotient aus der diffundierten und der vorgelegten Substanzmenge. Die Ermittlung der Konzentration an quartärer Verbindung erfolgt spektralphotometrisch.

⁺ - Ethylsulfonat: $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l

⁺⁺ Mittelwerte aus jeweils 5 Versuchen; Temp. $20^{+1}0^{\circ}\text{C}$

7. Membrandiffusion

Die Durchführung der Versuche erfolgt mit dem Resorptionsmodell nach Stricker (Sartorius, Göttingen) (117, 118).

7.1 Vorbereitung der Membranen

Verwendet werden als Träger Zellulosenitratfilter (Sartorius, Göttingen); Durchmesser 90 mm; im Fall der homologen Benzilsäurecholinesterbromide wird ein Porendurchmesser von 0,1 μm gewählt (Dicke 120 μm , Porosität ca. 75%). Die Membranfilter werden gewogen, ca. 20 min. in n-Octanol (wassergesättigt) gelegt, zwischen Saugpapier abgewalzt und abermals gewogen. Bezogen auf die wirksame Barrierenfläche von 40 cm^2 nehmen die Membranfilter ca. 0,26 ml n-Octanol auf (10 Messungen, $s_{\text{rel}} = 5,4\%$). Die Membranfilter für die Diffusion homologer Tridihexethylsalze werden entsprechend vorbehandelt, jedoch wird hier ein Porendurchmesser von 0,3 μm gewählt; n-Octanolaufnahme : 0,27 ml (10 Messungen; $s_{\text{rel}} = 7,2\%$). Nach Einspannen der jeweiligen Membranen in die Diffusionszelle des Sartorius- Resorptionsmodells werden die Lösungen aus Kompartiment I und II mittels Schlauchpumpe in laminarer Strömung an der Membran vorbeigeführt.

7.2 Durchführung der Diffusionsversuche

Die linke Kammer des Resorptionsmodells wird mit 100 ml wäßriger Arzneistofflösung ($c_{\text{IO}} = 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$) (Phase I), die rechte Kammer mit 100 ml dest. Wasser (Phase II) gefüllt (36^{+10} bzw. 37^{+10}C). Die Messung der Konzentrationsabnahme in Phase I bzw.

der Zunahme in Phase II erfolgt spektralphotometrisch (Benzilsäurecholinester : $\lambda_{\max} = 251,5 \text{ nm}$; Tridihexethylsalze: $\lambda_{\max} = 257 \text{ nm}$; Durchflußküvetten, PMQ III, Zeiss, Oberkochen; Registrierung: Schreiber Servogor S, Metrawatt, Nürnberg); jeweils mindestens zwei Diffusionsversuche, Abweichung kleiner 5%.

Bei den Diffusionsversuchen mit den Tridihexethylsalzen erfolgt, um osmotische Druckunterschiede, die die Stabilität der Membran beeinträchtigen, auszugleichen, in beiden Kompartimenten ein Zusatz von $0,1 \text{ Mol/l NaCl}^+$.

Im Falle des Tridihexethyl- C_{10} -sulfonats wird auch eine Membrandiffusion ohne NaCl-Zusatz durchgeführt, wobei neben der spektralphotometrischen Aufzeichnung, die das Kation erfaßt, gleichzeitig eine kontinuierliche Messung der Leitfähigkeit erfolgt⁺⁺. Es ergibt sich äquimolarer Übertritt von Kationen und Anionen; bei den Tridihexethyl-n-alkylcarboxylaten wird anstatt NaCl-Lösung Phosphatpuffer pH = 7,4, Ionenstärke $\mu = 0,1$ eingesetzt.

Im Fall des Tridihexethyl- C_{12} -sulfonats und des - C_{10} -sulfats werden Untersuchungen mit $c_{\text{IO}} = 1,0 \cdot 10^{-3}$ bzw. $1,3 \cdot 10^{-3}$ sowie $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$ durchgeführt. Aus den bei diesen Konzentrationen ermittelten $k_{\text{I,II}}$ - Werten erfolgt Extrapolation für $c_{\text{IO}} = 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$.

⁺ Bei Tridihexethylchlorid ist ohne NaCl-Zusatz kein Übertritt nachzuweisen.

⁺⁺ Die Übertrittsgeschwindigkeit ist unabhängig von NaCl-Zusatz.

7.3 Ermittlung der Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten $k_{I,II}$

7.3.1 Bestimmung unter Gleichgewichtsbedingungen

Die Diffusion einer Menge A aus einem Kompartiment I in ein Kompartiment II stellt eine Gleichgewichtseinstellung dar. Falls anfangs nur A vorhanden (und das Volumen von Kompartiment I = Kompartiment II) ist, wird solange A in II diffundieren, bis sich eine Gleichverteilung eingestellt hat. Damit läßt sich für die Abnahme von A entsprechend dem 1. Fickschen Gesetz folgende Differentialgleichung aufstellen:

$$\begin{aligned} - \frac{dA}{dt} &= k_{I,II} \cdot A - k_{II,I} (A_0 - A) \quad (Gl. 24) \\ &= (k_{I,II} + k_{II,I})A - k_{II,I}A_0 \end{aligned}$$

Integration ergibt

$$\log(A - A_\infty) = \log(A_0 - A_\infty) - (k_{I,II} + k_{II,I})t/2,303 \quad (Gl. 25)$$

bzw. in Konzentrationen:

für die Abnahme in Kompartiment I:

$$\log(c_I - c_{I\infty}) = \log(c_{I0} - c_{I\infty}) - (k_{I,II} + k_{II,I})t/2,303 \quad (Gl. 26)$$

bzw. die Zunahme in Kompartiment II:

$$\log(c_{II\infty} - c_{II}) = \log c_{II\infty} - (k_{I,II} + k_{II,I})t/2,303 \quad (Gl. 26a)$$

Die Auswertung bis zur Gleichgewichtseinstellung liegt Gl. 26 zugrunde; die Summe der Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten

* Nach Einstellung einer Gleichverteilung können die Geschwindigkeitskonstanten $k_{I,II} = k_{II,I}$ gleichgesetzt werden.

$k_{I,II}$ und $k_{II,I}$ ergeben sich sowohl aus der Konzentrationsabnahme im Kompartiment I als auch der -zunahme in Kompartiment II. Für ihre Ermittlung werden die experimentellen Werte der Gleichgewichtskonzentration herangezogen.

Bei der Membrandiffusion unter den Bedingungen einer Gleichgewichtseinstellung lassen sich allerdings zwei Grenzfälle unterscheiden:

- a) Gleichgewichtseinstellung ohne Membranbindung
der Homologen
- b) Gleichgewichtseinstellung mit Membranbindung

zu a) für Arzneistoffe vom Typ der Tridihexethylsalze ist die Membranbindung gering. Dies gilt auch für die lipophileren Homologen, bei denen eine meßbare Verteilung in das in der Barriere vorhandene n-Octanol zu verzeichnen ist. Nach kurzer Induktionsphase stellt sich für den gesamten Diffusionsverlauf ein quasistationärer Zustand ⁺ ein. Damit lassen sich die Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten sowohl aus der Konzentrationsabnahme in Kompartiment I (Abb. 28) wie auch aus der Zunahme in Kompartiment II ermitteln.

zu b) Bei Arzneistoffen vom Typ der Benzilsäurecholinesterbro-mide ist die Membranbindung sehr ausgeprägt. Da in diesem Fall dem Membrantransport keine Diffusion nach dem 1. Fickschen Gesetz zugrunde liegt (siehe 7.3.2), ist eine Auswertung entsprechend Gl. 26 nicht zulässig.

⁺ Der quasistationäre Zustand beinhaltet, daß zu bestimmten Zeiten die Substanzabnahme in Kompartiment I gleich der jeweiligen Substanzzunahme in Kompartiment II bzw. die Arzneistoffmenge in der Lipidbarriere für bestimmte Zeitabschnitte konstant ist (36, 43, 54, 78, 121).

7.3.2 Bestimmung unter "sink"-Bedingungen

Hierbei wird entweder das Experiment nur solange verfolgt, bis 10% der zur Gleichgewichtskonzentration führende Menge diffundiert sind. Das bedeutet Verfolgung nur des ersten Teils der Diffusionskinetik. Eine weitere Möglichkeit ist die ca. 20-fache Vergrößerung des Volumens in Kompartiment II.

a) ohne Membranbindung

Für die Diffusion durch eine Membran gilt dann für die Abnahme der Arzneistoffkonzentration in Kompartiment I entsprechend dem 1. Fickschen Gesetz die allgemeine Beziehung:

$$- dc_I/dt = k_{I,II} \cdot (c_I - c_{II}) \quad (\text{Gl. 27})$$

Nachdem in Kompartiment II unter "sink"-Bedingungen die Arzneistoffkonzentration gegenüber der in Kompartiment I sehr klein bleibt, vereinfacht sich Gl. 27 zu:

$$- dc_I/dt = k_{I,II} \cdot c_I \quad (\text{Gl. 27a})$$

Voraussetzung ist eine entsprechend lange Aufrechterhaltung des quasistationären Zustandes.

Durch Integration von Gl. 27a ergibt sich für die Auswertung der Anfangsphase:

Für die Abnahme in Kompartiment I:

$$\log c_I = \log c_{I0} - k_{I,II} t / 2,303 \quad (\text{Gl. 28})$$

Für die Zunahme in Kompartiment II:

$$\log (c_{I0} - c_{II}) = \log c_{I0} - k_{I,II} t / 2,303 \quad (\text{Gl. 28a})$$

Die Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten $k_{I,II}$ für die Abnahme in I werden aus der Geradenneigung bei halblogarithmischer Auftragung von c_I gegen die Zeit t zu Beginn der Diffusion entsprechend Gl. 28 bestimmt (Abb. 27). Zur Überprüfung dieses vereinfachten Verfahrens wird auch die Auswertung entsprechend Gl. 25 für den gesamten Arzneistofftransport durchgeführt werden (Abb. 28). Die Geradenneigung bei halblogarithmischer Auftragung gegen die Zeit t entspricht der Summe der Übertrittsgeschwindigkeitskonstanten für die Hin- sowie der Rückreaktion. Eine Gegenüberstellung der beiden Auswertungsverfahren zeigt gute Übereinstimmung.

b) mit Membranbindung

Bei Arzneistoffen vom Typ der Benzilsäurecholinesterbromide zeigt sich bei höheren Salzen z.T. erhebliche Bindung an die Barriere, die zu berücksichtigen ist. Die Konzentrationsabnahme an Arzneistoff erfolgt zwar rasch, das Erscheinen der lipophileren Homologen in Kompartiment II dagegen nur sehr langsam, da sich die Ester in der Membran anreichern. Zudem stellt sich während des Diffusionsvorganges in der Barriere kein stationärer bzw. quasi-stationärer Zustand ein. In diesem Fall liegt dem Membrantransport nicht mehr das 1. Ficksche Gesetz zugrunde. Allgemein wird die Arzneistoffdiffusion durch das zweite Ficksche Diffusionsgesetz (17, 35, 79, 115, 121) beschrieben:

$$\frac{\delta \cdot b(x,t)}{\delta t} = \frac{D \cdot \delta^2 b(x,t)}{\delta x^2} \quad (\text{Gl. 29})$$

Dabei ist b die Konzentration an undissoziiertem Arzneistoff in der Membran, t die Zeit, D der Diffusionskoeffizient für den Arzneistoff in der Barriere und x die Raumkoordinate, die senkrecht zur Membranfläche für die eindimensionale Diffusionsrichtung steht (17, 35, 79, 115, 121). Danach ist die Konzentrationsänderung in der Membran von Ort (x) sowie der Zeit (t) abhängig, da x jeden Wert von 0 bis d annehmen kann (79).

Unter bestimmten Voraussetzungen jedoch läßt sich auch in diesem Fall eine Übertrittsgeschwindigkeitskonstante $k_{I,II}$ ermitteln: Bei Homologen mit hoher Membranbindung entspricht die Anfangsphase des Diffusionsprozesses den Vorgängen in einem Zweiphasenmodell (79), wobei die Membran durch ihre hohe Bindungskapazität anfänglich als "sink" wirkt (51, 79, 115, 121). Dies konnte durch experimentelle Befunde bestätigt werden (79). Damit entspricht die Diffusions-Zeitkurve dem Diffusionsvorgang unter "sink"-Bedingungen, allerdings wiederum nur für den Anfangsverlauf. Die Auswertung für die Arzneistoffabnahme in Kompartiment I läßt sich daher entsprechend Gl. 28 durchführen.

7.4 Membranbindung

Die Membranbindung wird aus der Differenz der vorgelegten Substanzmenge $c_{I0} \cdot V_I$ und der nach Beendigung des Diffusionsversuchs (= Einstellung des Gleichgewichts) entsprechend III.2 und III.3 noch vorhandenen Menge ($c_{I\infty} \cdot V_I + c_{II\infty} \cdot V_{II}$) bestimmt. Aus der in der Lipidbarriere B verbliebenen Restmenge läßt sich entsprechend der in III.4 angegebenen Beziehungen die jeweilige Membranbindungskonstante errechnen. Ebenso wird die Sorption der

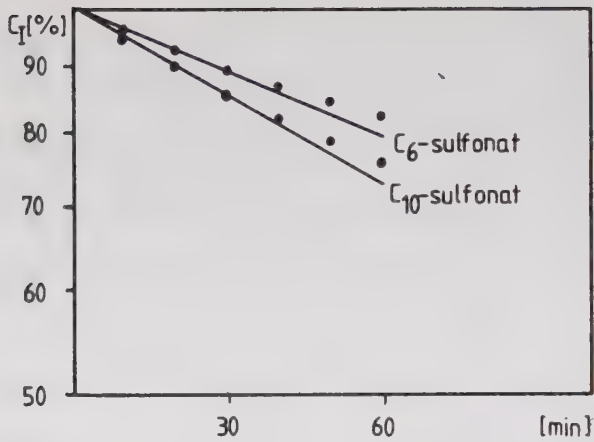


Abb. 27 : Abnahme von Tridihexethylethylsulfonat und -decylsulfonat in Kompartiment I als Funktion der Zeit entsprechend Gl. 28

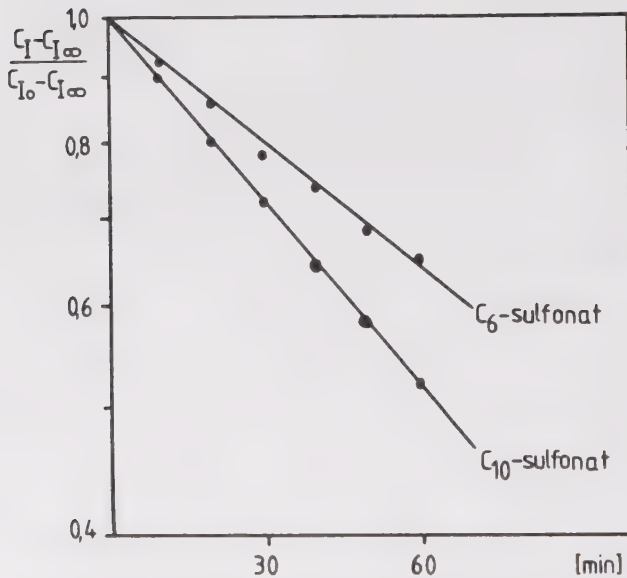


Abb. 28 : Quotienten der Konzentrationsdifferenz $(C_I - C_{I\infty}) / (C_{I0} - C_{I\infty})$ als Funktion der Zeit entsprechend Gl. 26

Octyl-, Decyl- und Dodecylderivate der Benzilsäurecholinesterbromide durch Stützbarrieren (ohne n-Octanol) ermittelt (Anfangskonzentration $2,0 \cdot 10^{-3}$ Mol/l). Bei den homologen Tridihexethyl-n-alkylsulfonaten erfolgt Bestimmung der Membranbindung zusätzlich zu der aus den Diffusionsversuchen: Jeweils 1/2 Membran (n-Octanol-gesättigt) in 100 ml Steilbrustflaschen (Temp. $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$), Ausgangskonzentration $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, Schüttelbewegung). Es zeigt sich lediglich beim Decyl- und Dodecylhomologen eine meßbare Sorption.

8. Bestimmung der akuten Toxizität an der Maus

Mäusen NMRI, männlich (Wiga, Sulzfeld), 24 - 26 g, werden homologe Tridihexethyl-n-alkylsulfonate sowie Tridihexethylchlorid, gelöst in physiologischer NaCl-Lösung, intraperitoneal injiziert (Injektionsvolumen ca. 0,5 ml; 8 - 10 Dosen bei Konstanthaltung der Dosenabstände: $1,35 - 4,2 \cdot 10^{-4}$ Mol/kg; jeweils 6 Mäuse/Dosis). Daneben werden als Vergleich die jeweils dreifachen (im Fall des Decylhomologen zweifachen) Konzentrationen der entsprechenden Na-n-alkylsulfonate in derselben Weise appliziert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe des Probitverfahrens (6, 13, 31). Die Prüfung auf Signifikanz der Unterschiede der LD_{50} - Werte wird mittels Varianzanalyse durchgeführt.

9. Untersuchungen der spasmolytischen Wirkung am isolierten Jejunum der Ratte

Männliche Sprague-Dawley Ratten (Eigenzucht des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München), 250 - 300 g, werden durch Nackenschlag getötet und ihnen das Jejunum entnommen. Nach Entfernen des Mesenteriums lassen sich 3 - 5 cm lange, kotleere Darmabschnitte gewinnen. Sie werden an beiden Enden abgebunden und in ein Tyrodebad ⁺ von 34°C eingehängt; während des Versuchs Durchströmung mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂). Die Belastung des Organteils erfolgt mit 1,5 g, Adaption etwa 30 min. unter mehrmaliger Erneuerung der Badflüssigkeit. Die Muskelkontraktionen werden durch Acetylcholin ausgelöst, über Dehnungsmeßstreifen gemessen und mit Hilfe eines Verstärkers und Kompensationsschreibers registriert. Zur Erstellung der kumulativen Dosis-Wirkungskurven erfolgt Erhöhung der Acetylcholinkonzentrationen im Organbad in geometrischer Reihe ($4 \cdot 10^{-8}$ bis $32\,768 \cdot 10^{-8}$ Mol/l) bis die maximale Kontraktion erreicht ist. Nach Abschluß einer solchen Versuchsreihe wird die Badflüssigkeit erneuert und die Entspannung des Jejunumabschnitts abgewartet. Dann erfolgt Zusatz der zu untersuchenden Substanz ⁺⁺ und nach

⁺ Zusammensetzung: NaCl 7,0 g, KCl 0,36 g, CaCl₂ 0,275 g, MgCl₂ · 6H₂O 0,25 g, NaHCO₃ 1,325 g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0,1875 g und 2,0 g Glucose ad 1 000,0 ml dest. Wasser

⁺⁺ Neben den Tridihexethylsalzen wurde auch eine entsprechende Untersuchung mit Na-decylsulfonat durchgeführt. Hierbei kann keine Hemmwirkung nachgewiesen werden.

3 min. Inkubationszeit Ermittlung der Kontraktion mit Zugabe von Acetylcholin in der oben angeführten Weise. Zur Berechnung der relativen Kontraktionen werden die jeweiligen Meßwerte in Relation zum Kontraktionsmaximum gesetzt (116).

Die in den Abbildungen eingezeichneten Punkte entsprechen dem Mittelwert ($n = 6$, 2 Organpräparate mit jeweils 3 Versuchen). Die Berechnung der ID_{50} erfolgt nach dem Probitverfahren⁺ (6, 13, 31, 116): Die ID_{50} - Werte für die Hemmstoffkonzentration werden jeweils aus Probitgeraden für Probit = 5 bestimmt. Diese Gerade läßt sich aus den Probits erstellen, die die Verringerung der Maximalkontraktion durch die einzelnen Hemmstoffkonzentrationen wiedergeben.

⁺ Erstellung des Rechenprogramms für die Probitanalyse und Durchführung der Rechnungen erfolgten am Rechenzentrum der Universität Düsseldorf. Herrn Dr. Lehmacher danke ich für die gewährte Hilfestellung.

Tab. 15 : Mittelwerte ($\bar{x}$) der relativen Kontraktionshöhe
in % von Jejunum-Abschnitten nach Zusatz von
Acetylcholin unter Einwirkung von Tridihexethylethyl-
sulfonat
(Tyrodelösung, 34°C; 6 Versuche pro Konzentration)

Konzentr. von Acetyl- cholin (Mol/l) $\cdot 10^{-8}$	relative Kontraktionshöhe % [±] s Konzentration des Hemmstoffs			
	0	$1,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l	$5,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l	$1,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
4	1,8 $\pm$ 0,7	0,8 $\pm$ 0,4	-	-
16	3,6 $\pm$ 1,3	1,8 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,2
32	6,8 $\pm$ 0,9	4,0 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,5
64	14,8 $\pm$ 1,9	8,6 $\pm$ 1,4	6,4 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 1,4
128	31,3 $\pm$ 3,8	18,1 $\pm$ 1,9	13,5 $\pm$ 2,7	9,2 $\pm$ 1,9
256	46,6 $\pm$ 4,9	35,7 $\pm$ 3,1	23,0 $\pm$ 2,3	15,8 $\pm$ 2,9
512	58,1 $\pm$ 6,0	46,9 $\pm$ 3,7	37,1 $\pm$ 3,1	25,2 $\pm$ 3,2
1024	71,0 $\pm$ 3,3	59,7 $\pm$ 6,6	51,4 $\pm$ 3,5	38,2 $\pm$ 3,7
2048	84,3 $\pm$ 3,4	67,8 $\pm$ 4,8	63,6 $\pm$ 4,2	50,9 $\pm$ 3,8
4096	93,9 $\pm$ 2,9	80,6 $\pm$ 3,4	73,3 $\pm$ 3,1	65,7 $\pm$ 3,5
8192	98,1 $\pm$ 1,8	91,1 $\pm$ 2,1	85,4 $\pm$ 2,5	82,8 $\pm$ 2,8
16384	99,4 $\pm$ 1,3	98,2 $\pm$ 1,7	96,0 $\pm$ 2,1	93,1 $\pm$ 0,9
32768	-	99,0 $\pm$ 0,4	98,6 $\pm$ 0,9	96,0 $\pm$ 1,5

Tab. 16 : Mittelwerte ($\bar{x}$) der relativen Kontraktionshöhen
in % von Jejunum-Abschnitten nach Zusatz von
Acetylcholin unter Einwirkung von Tridihexethyl-
dodecylsulfonat
(Tyrodelösung, 34°C; 6 Versuche pro Konzentration)

Konzentr. von Acetyl- cholin (Mol/l) $\cdot 10^{-8}$	relative Kontraktionshöhe (%) $\pm s$ Konzentration des Hemmstoffs			
	0	$1,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l	$5,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l	$1,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
4	1,9 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,5	-	-
16	4,8 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 1,0	0,8 $\pm$ 0,4	-
32	8,9 $\pm$ 1,2	5,6 $\pm$ 1,5	3,2 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,5
64	16,4 $\pm$ 3,2	10,1 $\pm$ 1,4	5,3 $\pm$ 2,1	3,3 $\pm$ 1,4
128	30,9 $\pm$ 3,5	20,5 $\pm$ 2,8	14,8 $\pm$ 2,6	9,5 $\pm$ 2,5
256	49,3 $\pm$ 5,1	39,7 $\pm$ 4,8	23,4 $\pm$ 3,3	18,6 $\pm$ 3,1
512	57,6 $\pm$ 7,7	54,9 $\pm$ 5,4	37,0 $\pm$ 3,4	29,4 $\pm$ 3,8
1024	75,5 $\pm$ 3,3	63,7 $\pm$ 5,6	54,0 $\pm$ 4,9	42,1 $\pm$ 4,3
2048	85,4 $\pm$ 3,0	73,6 $\pm$ 6,0	64,2 $\pm$ 4,4	57,2 $\pm$ 5,1
4096	96,2 $\pm$ 1,7	83,1 $\pm$ 4,1	75,5 $\pm$ 3,7	69,0 $\pm$ 3,7
8192	99,3 $\pm$ 2,1	93,2 $\pm$ 2,4	85,9 $\pm$ 2,1	83,9 $\pm$ 2,6
16384	99,8 $\pm$ 1,1	98,8 $\pm$ 1,1	97,6 $\pm$ 1,5	91,9 $\pm$ 2,3
32768	-	99,1 $\pm$ 0,4	98,3 $\pm$ 0,8	97,6 $\pm$ 2,0

Tab. 17 : Mittelwerte ($\bar{x}$) der relativen Kontraktionshöhen
in % von Jejunum-Abschnitten nach Zusatz von
Acetylcholin unter Einwirkung von Tridihexethyl-
chlorid
(Tyrodelösung, 34°C; 6 Versuche pro Konzentration)

Konzentr. von Acetyl- cholin (Mol/l) $\cdot 10^{-8}$	relative Kontraktionshöhe (%) $\pm s$ Konzentration des Hemmstoffs			
	0	$1,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l	$5,0 \cdot 10^{-6}$ Mol/l	$1,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
4	2,0 $\pm$ 0,9	0,9 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,2	-
16	3,4 $\pm$ 1,1	2,1 $\pm$ 0,9	1,1 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,4
32	5,7 $\pm$ 1,2	3,8 $\pm$ 1,1	2,3 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,5
64	15,9 $\pm$ 2,3	9,6 $\pm$ 1,4	6,0 $\pm$ 1,2	4,1 $\pm$ 0,8
128	33,8 $\pm$ 6,8	17,9 $\pm$ 2,9	12,1 $\pm$ 2,0	9,1 $\pm$ 1,3
256	51,6 $\pm$ 11,8	26,5 $\pm$ 3,5	19,9 $\pm$ 2,8	16,2 $\pm$ 1,4
512	63,2 $\pm$ 5,5	43,8 $\pm$ 5,5	31,4 $\pm$ 2,9	25,5 $\pm$ 3,5
1024	75,8 $\pm$ 2,8	57,9 $\pm$ 5,9	52,9 $\pm$ 4,7	40,4 $\pm$ 3,1
2048	84,4 $\pm$ 4,9	68,7 $\pm$ 3,1	60,9 $\pm$ 3,3	51,1 $\pm$ 3,3
4096	94,5 $\pm$ 2,1	83,9 $\pm$ 3,2	69,6 $\pm$ 3,7	60,7 $\pm$ 4,1
8192	98,9 $\pm$ 3,2	89,0 $\pm$ 2,9	81,9 $\pm$ 2,8	79,3 $\pm$ 3,1
16384	99,7 $\pm$ 1,7	96,2 $\pm$ 1,4	89,8 $\pm$ 1,2	90,5 $\pm$ 2,2
32768	-	98,9 $\pm$ 0,8	94,4 $\pm$ 0,9	97,6 $\pm$ 1,1

10. Ausscheidung nach peroraler Applikation an der Maus, Ionenpaarextraktion

10.1 Versuchsdurchführung

Wäßrige Lösungen des Tridihexethylethylsulfonats und des Tridihexethyldecylsulfonats werden jeweils viermal alternierend mittels Schlundsonde je drei Mäusen peroral appliziert. Die Wartezeit zwischen Applikation von Test und Standard beträgt bei den gepaarten Versuchen jeweils 3 Tage. Die Dosis wird mit $3,0 \cdot 10^{-4}$ Mol/kg (in ca. 0,5 ml) konstant gehalten. Urin und Faeces werden in Stoffwechselkäfigen (Ehret, Emmendingen) getrennt gesammelt und nach 24, 48 und 72 Stunden entleert.

10.2 Ionenpaarextraktion

Die analytische Erfassung des Tridihexethylkations erfolgt nach Extraktion in Form von Ionenpaaren in der organischen Phase (16, 50, 63, 69, 76). Hierzu werden die Urinproben (ca. 0,5 ml) mit $5,0 \cdot 10^{-3}$ molarer Methylorangelösung ⁺ auf 5,0 ml die Faecesproben (ca. 2 g) in 5,0 ml der Methylorangelösung ⁺ suspendiert, mit dem Ultra-Turrax homogenisiert und die Suspension 15 min. bei 6000 Upm zentrifugiert, dann auf 5,0 ml aufgefüllt. Diese Lösungen werden jeweils mit 10,0 ml Chloroform DAB7 (Merck, Darmstadt) versetzt und einmal 30 min. geschüttelt. Nach Abtrennung der Phasen erfolgt zentrifugieren der Chloroformphase.

Die Bestimmung der Konzentration an Tridihexethyl-Methylorangenionenpaaren erfolgt spektralphotometrisch bei $\lambda = 416$ nm (PMQ III, Zeiss, Oberkochen). Die Auswertung erfolgt mittels Eichgeraden (Abb. 29), denen Extraktionen aus Urin und Faeces für jede einzelne Maus zugrunde liegen.

⁺ In Phosphatpuffer, pH 7,4, Ionenstärke $\mu = 0,1$

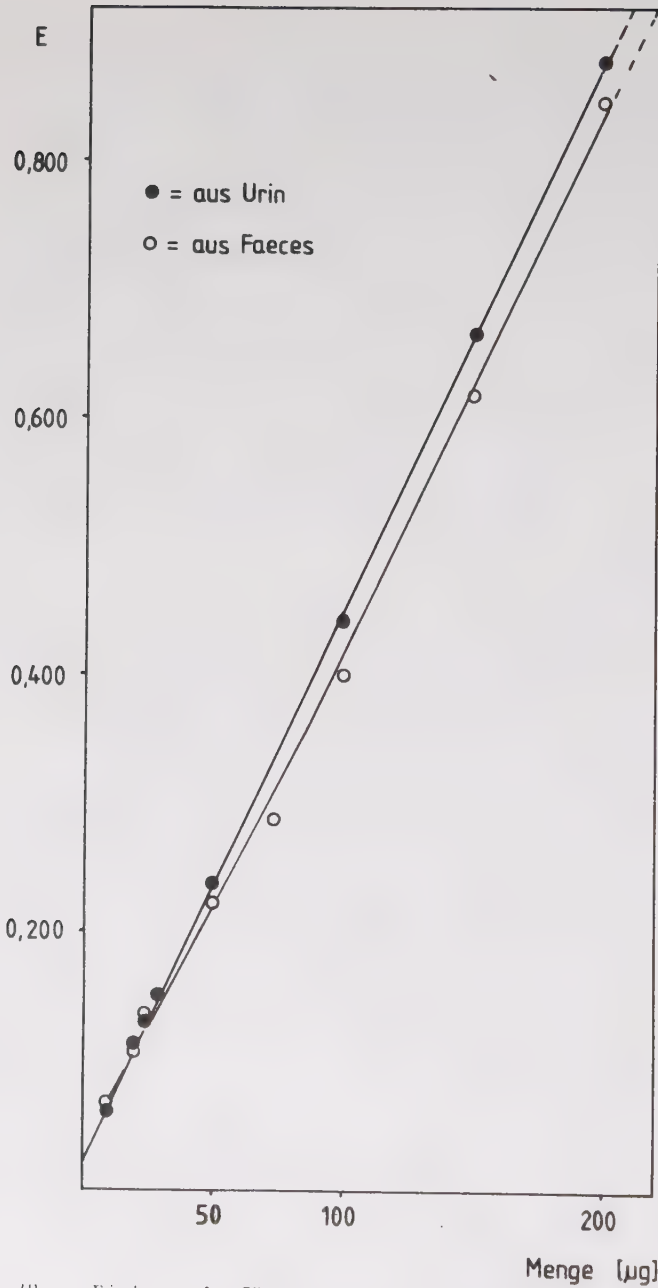


Abb. 29 : Eichgerade für die Chloroformextrakte von Tridihexethyl-methylorangeionenpaaren aus Urin und Faeces Maus 3, $\lambda = 416 \text{ nm}$

Leerwerte von Urin und Faeces werden dabei entsprechend der Eichkurve berücksichtigt. Die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes wird dabei bestätigt. Unter den genannten Versuchsbedingungen liegt die Erfassungsgrenze ohne Leerwerte bei ca. 1 µg, mit Einbeziehung der Leerwerte bei ca. 5 - 10 µg. Die Menge an Methylorangegegenionen reicht aus (ca. 4-facher Überschuß), um auf einmal die insgesamt gegebene Dosis mit nur einer Ausschüttelung quantitativ erfassen zu können. Abb. 30 zeigt, daß zu einer quantitativen Extraktion des Tridihexethylkations mindestens eine 1,5-fache Gegenionenkonzentration an Methylorangeanionen erforderlich ist. Gleichzeitig weist der Kurvenverlauf darauf hin, daß es sich um ein 1:1 - Ionenpaar handeln dürfte.

Aus dieser Untersuchung läßt sich gleichzeitig die molare Extinktion des Tridihexethyl-Methylorangeionenpaares zu $2,71 \cdot 10^4$ bestimmen. Dieser Wert ist mit dem anderer Methylorangeionenpaare vergleichbar: Chatten und Okamura (16) beschreiben die molaren Extinktionen von 8 Methylorangeionenpaaren quartärer Ammoniumverbindungen. Sie liegen bei $2,36$ bis $3,24 \cdot 10^4$; es handelt sich jeweils um 1:1 - Ionenpaare.

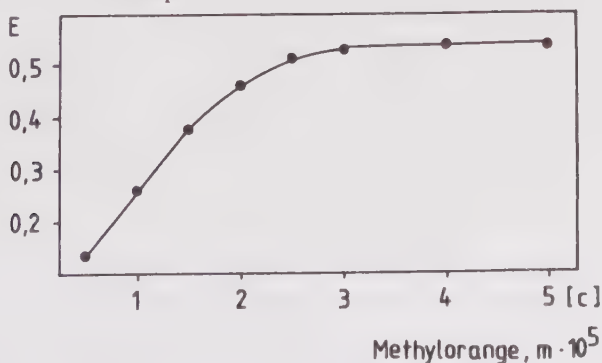


Abb. 30 : Abhängigkeit der Extinktion des CHCl_3 -Extraktes von der Methylorangegegenionenkonzentration
 $(\lambda_{\text{max}} = 416, c_0 \text{ Tridihexethylchlorid} = 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l})$

11. Pharmakokinetische Untersuchungen am Hund, Hochdruckflüssigkeitschromatographie

11.1 Versuchsdurchführung

Für die perorale und intravenöse Testung werden 2 Hunde (Schäfer, 25 kg und 31 kg) verwendet. Die jeweilige Dosis beträgt $1,17 \cdot 10^{-5}$ Mol/kg bei intravenöser Applikation (= 5 mg/kg für das Tridihexethylethylsulfonat und 6,5 mg/kg für das Tridihexethyldecylsulfonat) und $4,68 \cdot 10^{-5}$ Mol/kg bei peroraler Gabe (= 20 mg/kg für das Tridihexethylethylsulfonat und 26 mg/kg für das Tridihexethyldecylsulfonat). Die Reihenfolge der Gabe richtet sich nach folgendem Versuchsplan:

Hund I			Hund II		
Vers.Nr.	Anion	Appl.-art	Vers.-Nr.	Anion	Appl.-art
1		i.v.	2		i.v.
3	Decyl-sulf.	p.o.	4	Ethyl-sulf.	p.o.
5		i.v.	6		i.v.
7		p.o.	8		p.o.
9	Ethyl-sulf.	i.v.	10	Decyl-sulf.	i.v.
11		p.o.	12		p.o.

Vor der Gabe werden die Versuchstiere jeweils 1 Tag nüchtern gehalten. Die Wartezeit zwischen den Versuchen beträgt je Hund 14 Tage. Bei i.v.-Applikation werden ca. 15 - 20 ml des Arzneistoffs in physiologischer Kochsalzlösung innerhalb von ca. 5 min.

in die Vena brachialis anterior injiziert. Die perorale Applikation wäßriger Lösungen (ca. 80 ml) der Salze des Tridihexethyls erfolgt mittels Schlundsonde.

Um die Schlundsonde und den Urinkatheter leichter legen zu können, werden die Versuchstiere vor Versuchsbeginn anaesthetisiert (Nembutal, Abott, Ingelheim, 25 mg/kg, i.v.). Dies wird zur Aufrechterhaltung gleicher Versuchsbedingungen auch bei den i.v.-Gaben eingehalten.

Die Blutentnahme (Braunüle, Braun, Melsungen) erfolgt i.a. aus der Vena jugularis 10, 20, 30 Minuten, 1, 2, 3, 4, 6 (bzw. 5,7), z.T. 10 sowie 24 und 30 Stunden nach Applikation der jeweiligen Lösungen. Die Urinentnahme mittels eines Dauerkatheters ergibt Sammelwerte für 2, 4 und 6 Stunden ⁺. Die jeweiligen Blutproben werden in citratisierten Einmalzentrifugengläsern gesammelt und sofort aufgearbeitet. Eiweißfällung wird nicht durchgeführt, da hierbei die quantitative Bestimmung verfälschende Adsorptionen des quartären Arzneistoffes an Proteine erfolgt ⁺⁺.

⁺ Die applizierten Dosen rufen bei beiden Hunden sowohl nach i.v.- wie auch peroraler Gabe Urinretention hervor. In ähnlicher Weise wird auch antidiuretische Aktivität nach Applikation hoher Dosen von Tridihexethyljodid bei der Ratte beschrieben (92). Der im Untersuchungszeitraum gewonnene Urin beträgt insgesamt nur 22 bis 34 ml.

⁺⁺ An Hand von Eichgeraden kann nachgewiesen werden, daß zwischen 0,01 und 5 µg/ml Plasma quantitative Extraktion des Spasmolytikums mit Hilfe der Ionenpaarverteilung erfolgt.

Ebenso ist sofortige Aufarbeitung des Urins erforderlich (Veränderung des Chromatogramms, auch nach Einfrieren der Proben). Da bei beiden Versuchstieren sowohl nach i.v.- als auch nach peros -Gabe eine Auswertung nach 6 Stunden nicht mehr möglich ist, wird nach vier Versuchen auf die Urinentnahme generell verzichtet.

11.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographische Analytik von Tridihexethylsalzen

Zur Isolierung und Bestimmung der im Plasma bzw. Urin vorhandenen geringen Arzneistoffmengen ist eine empfindliche und selektive Methode notwendig. Hierzu eignet sich im besonderen Maß die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) (2, 15, 56, 97, 100, 103, 109, 126).

Allerdings ist auch hierbei vorherige Extraktion zur Abtrennung eines Teils der Begleitstoffe und zur Anreicherung notwendig. Diese erfolgt in Form von Ionenpaaren (16, 43, 63, 69, 76). Als lipophiles Anion wird das nicht UV-aktive Decylsulfat eingesetzt, um eine hohe Spezifität zu gewährleisten.

11.2.1 Verfahren

Gerät: Hochdruckflüssigkeitschromatograph mit automatischer Probeneinspritzung und eingebautem Integrator und Schreiber (Hewlett-Packard, Frankfurt, Typ 1080)

Detektion: Zweistrahl-spektralphotometrischer Detektor (Schoeffel, Trappenkamp, Typ SF 770-1) mit variablem Wellenlängenbereich.

Methodik : "Reversed-phase"-Ionenpaarchromatographie (22).

Versuchs-
bedingungen⁺ : Mobile Phase: CH₃CN/H₂O (8/2)

(Acetonitril Uvasol, Merck, Darmstadt)

0,005 m Decylsulfat-Na (Henkel, Düsseldorf)

0,1 % Propionsäure pH 3,3 (Schuchardt, München)

Säule: Lichrosorb RP8 (Kohlenwasserstoffphase (C₈)

chemisch durch hydrolysestabile Si-O-Si-C-
Bindungen an Kieselgel gebunden),

25 cm x 4 mm Ø, 10 µ, (Hewlett-Packard,
Frankfurt)

Detektion: = 190 nm (unter "Stickstoffspülung")

Interner Standard: Benziloniumbromid (3-Hydroxy-
1,1-diethylpyrrolidiniumbromid)-
benzilat (Parke-Davis u. Co.,
Detroit, USA)

Fließrate 3 ml/min.

Injektionsvolumen: 10 µl, bei geringen enthaltenen
Mengen: 200 µl

Nachweisgrenze: ca. 0,005 µg/10 µl Dosiervolumen

Auswertung: Eine Detektion bei 257 nm ergibt keine ausreichende
Nachweisgrenze; optimal erweist sich die Wellen-
länge 190 nm.

Die quantitative Auswertung erfolgt über automatische Integration
der Peakflächen. Die Zugabe eines internen Standards (Benzilo-

⁺ Herrn Dr. Schuster (Hewlett-Packard, Krötzingen) danke ich
für die Hilfe bei der Entwicklung der Methode und Versuchs-
bedingungen.

niumbromid, 0,2 µg in 200 µl) ermöglicht eine genaue Berechnung der extrahierten Menge an Tridihexethyldecylsulfat, da hiermit Fehler durch Überführungsverluste eliminiert werden. Wegen des Grundrauschens des Detektors wird bei kleinen Peakflächen ein additiver, weitgehend konstanter Peakflächenfehler, der der "Rauschfläche" unterhalb des Peaks entspricht, gemacht. Dies gilt auch für das Benzilonium-decylsulfat, bei dem wegen eines benachbarten Lösungsmittelpeaks die Grundlinie am zuvor erhaltenen Peakthal durch den Integrator gesetzt wird. Daher sind Eichkurven von Tridihexethyldecylsulfat und Benzilonium-decylsulfat unterhalb von 25 bzw. 30 ng nicht mehr linear (Abb. 31)

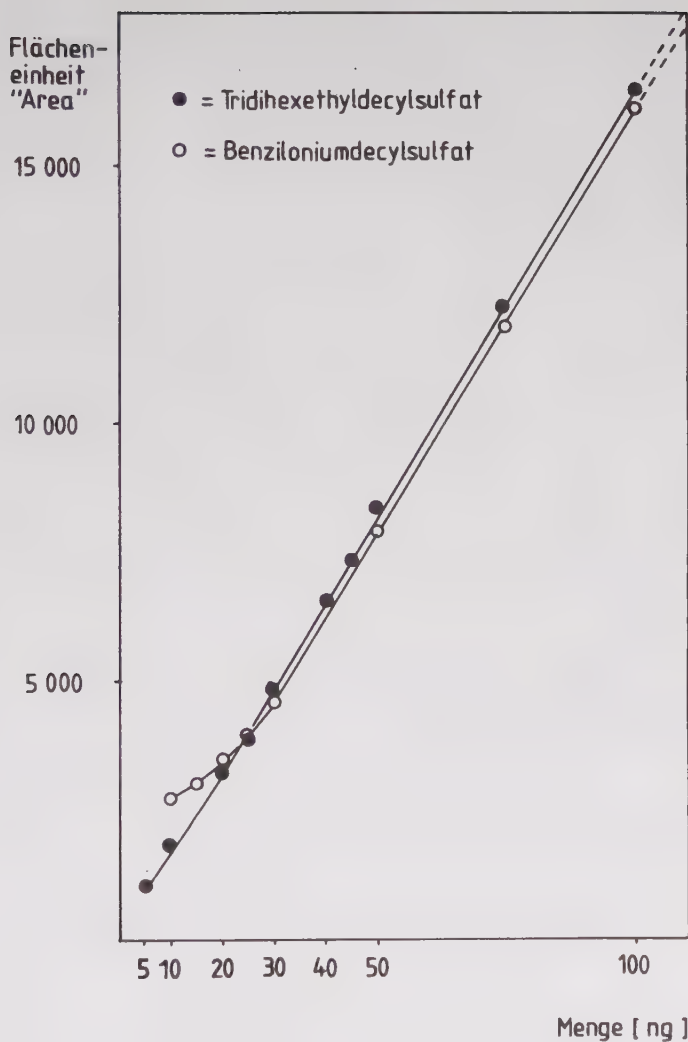


Abb. 31 : Eichgerade für Tridihexethyl- sowie Benzilonium-decylsulfat (Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Injektionsvolumen 10 μ l)

Mittelwerte aus n = 5 Probenaufgaben wäßriger Lösungen

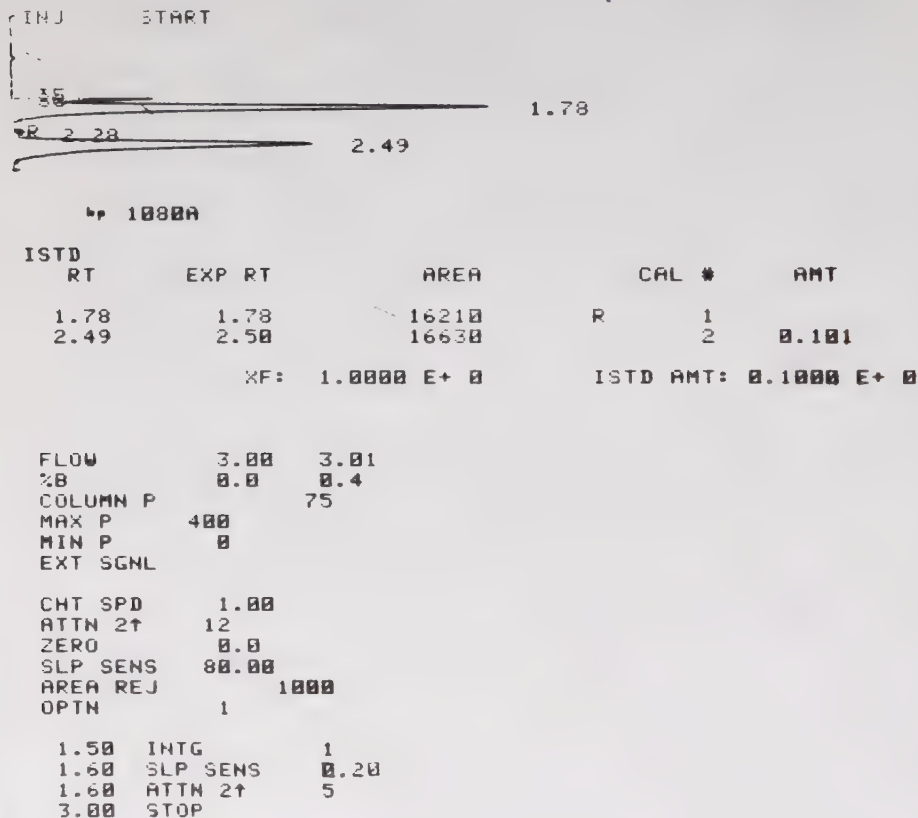


Abb. 32 : Trennung und quantitative Bestimmung von Benzilonium-decylsulfat und Tridihexethyldecylsulfat (jeweils 100 ng)

Mobile Phase: Acetonitril/Wasser (80/20)

Stat. Phase: Lichrosorb RP8

Injektionsvolumen: 10 µl (wäßrige Lösung)

Detektion: UV, 190 nm

(alle weiteren Angaben sind im Chromatogramm enthalten)

Ein Nachweis auf quantitativen Übergang der Ionenpaare in die Methylenchloridphase erfolgt durch HPLC-Analyse wäßriger Lösungen nach Extraktion: Analysengenauigkeit nach Extraktion aus wäßriger Lösung: 100 ng/ μ l Dosiervolumen, $s_{rel}=1,8\%$ (n=10)
10 ng/ μ l Dosiervolumen, $s_{rel}=12,4\%$ (n=10)

Abb. 32 zeigt ein vom Schreiber erhaltenes Chromatogramm der Trennung und Auswertung von jeweils 100 ng Benziloniumdecylsulfat (Retentionszeit = 1,78 min.) und Tridihexethyldecylsulfat (Retentionszeit = 2,49 min.) mit den hierzu erforderlichen Angaben.

11.2.2 Bestimmung in Plasma

Hierzu wird jeweils 10 - 11 ml Vollblut 15 min. bei 6000 Upm zentrifugiert und 5,0 ml Plasma abgehebert. Dieses wird mit 1 ml einer 10^{-2} molaren Natriumdecylsulfatlösung (= Gegenion), 200 μ l einer Benzilonium-Br-Stammlösung (= interner Standard, 100 mg/l) und 2 ml Methylenchlorid (Merck, Darmstadt) versetzt und in 10 ml Zentrifugengläsern 30 min. verschlossen geschüttelt. Zur besseren Trennung wird 15 min. bei 6000 Upm zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wird mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und verworfen. Die untere Methylenchloridphase wird mit einer weiteren Pasteur-Pipette in ein neues Zentrifugenglas überführt und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit 200 μ l frisch destilliertem Wasser aufgenommen und verschlossen 30 min. geschüttelt. Die Lösung wird in 200 μ l Probenfläschchen (Weidmann, Romannshorn, Schweiz) möglichst quantitativ überführt und zur HPLC-Aufgabe bereitgestellt. Meßwerte siehe Tab. 18 und 19.

11.2.3 Bestimmung in Urin

Von dem erhaltenen Urin werden jeweils Aliquote von 1,0 ml ⁺ mit verdünnter HCl auf pH 3 eingestellt und auf 5,0 ml mit dest. Wasser aufgefüllt ⁺. Die Weiterbehandlung erfolgt entsprechend der Bestimmung aus Plasma.

Allerdings zeigt sich bereits beim 4-Stunden-Urin eine Überlagerung von Peaks im Chromatogramm in der Nähe des Tridihexethylpeaks. Nach 6 Stunden ist eine quantitative Auswertung durch weitere Verstärkung der Überlagerung nicht mehr möglich. Ansonsten werden folgende Meßwerte erhalten:

Versuch 1 : nach 2 Stunden 13,93 mg, nach 4 Stunden 1,14 mg
Tridihexethyldecylsulfonat

Versuch 2 : nach 2 Stunden 12,56 mg, nach 4 Stunden 2,01 mg
Tridihexethylethylsulfonat

Versuch 3 : nach 2 Stunden 8,42 mg, nach 4 Stunden 3,51 mg
Tridihexethyldecylsulfonat

Versuch 4 : nach 2 Stunden 6,6 mg, nach 4 Stunden 1,79 mg
Tridihexethylethylsulfonat

⁺ Bei hohen Konzentrationen wird 1,0 ml mit dest. Wasser auf 10,0 bzw. 100,0 ml aufgefüllt und hiervon 1,0 ml entnommen. Hiernach erfolgt Einstellung auf pH 3.

Tab. 18 : Arzneistoffmengen im Plasma in Abhängigkeit von der
Entnahmezeit bei Tridihexethylethylsulfonat (µg/ml)

Versuchs-Nr.	2	4	6	7	9	11
Hund	II	II	II	I	I	I
Applikation	i.v.	peroral	i.v.	peroral	i.v.	peroral
Dos. (mg/kg)	5	20	5	20	5	20
Entnahmezeit (Std.)	0,17	-	0,056	1,068	0,049	0,967
	0,33	0,780	0,088	-	0,119	0,662
	0,5	0,547	0,152	0,629	0,135	0,613
	0,75	-	-	0,485	-	-
	1	0,315	0,196	0,397	0,307	0,499
	2	0,155	0,123	0,266	0,161	0,248
	3	0,103	-	0,163	0,101	0,164
	4	0,077	0,064	0,135	-	-
	5	-	-	-	0,038	0,128
	6	0,067	-	0,092	-	-
	7	-	0,046	-	0,039	0,098
	10	-	0,034	0,065	0,032	-
	24	0,015	0	0,019	0	0,025
	30	0,011	0	0	0	0

Tab. 19 : Arzneistoffmengen im Plasma in Abhängigkeit von
der Entnahmezeit bei Tridihexethyldecylsulfonat
($\mu\text{g/ml}$)

Versuch-Nr.	1	3	5	8	10	12
Hund	I	I	I	II	II	II
Applikation	i.v.	peroral	i.v.	peroral	i.v.	peroral
Dos. (mg/kg)	6,5	26	6,5	26	6,5	26
Entnahmezeit (Std.)	0,17	1,320	0,096	1,502	-	1,443 0,064
	0,33	1,063	-	1,160	-	0,936 0,132
	0,5	-	0,294	0,955	0,298	0,650 0,303
	0,75	-	-	-	0,401	- -
	1	0,517	0,212	0,689	0,330	0,586 0,253
	2	0,220	0,146	0,297	0,223	0,298 0,149
	3	0,089	0,098	0,171	0,100	0,252 0,116
	4	0,075	-	-	-	0,185 -
	5	0,078	0,058	0,133	0,075	- 0,070
	6	-	-	-	-	0,156 -
	7	0,061	0,064	0,095	0,046	- 0,062
	10	-	0,035	0,082	0,031	0,098 0,041
	24	0,018	0	0,013	0	0,027 0
	30	0,012	0	0	0	0,020 0

11.3 Auswertung der Meßergebnisse durch Abschälen

Zunächst erfolgt die Bestimmung der Hybrid-Geschwindigkeitskonstanten α und β durch graphisches Abschälen (42). Diese Werte dienen als Anhaltspunkte für das weitere Vorgehen.

Allgemein gilt für den Arzneistofftransport bei Geschwindigkeiten für das offene Zwei-Kompartimentmodell folgende biexponentielle Gleichung (42, 80):

$$B = Ae^{-\alpha t} + B'e^{-\beta t} \quad (\text{Gl. 30})$$

bzw. in Konzentrationen

$$b = \frac{A}{V} \cdot e^{-\alpha t} + \frac{B'}{V} \cdot e^{-\beta t} = ae^{-\alpha t} + b'_0 e^{-\beta t} \quad (\text{Gl. 31})$$

Hierbei charakterisiert die α -Phase die Verteilung und die β -Phase die Elimination (Abb. 21). Bei schneller Verteilung des Arzneistoffs zwischen zentralem und peripherem Kompartiment ist $\alpha \gg \beta$, so daß mit zunehmender Zeit t der Ausdruck $e^{-\alpha t}$ gegen 0 geht. Dabei ist $A = a'V$ und $B' = b'_0 \cdot V$. Hierbei bezeichnet a den Achsenabschnitt der abgeschälten Verteilungsgerade bei $t = 0$ und b'_0 den Achsenabschnitt der extrapolierten Eliminationsgeraden bei $t = 0$. Somit gilt

$$b = b' = b'_0 \cdot e^{-\beta t} \quad (\text{Gl. 32})$$

bzw. umgeformt:

$$\log b = \log b' = \log b'_0 - \beta/2,303 t \quad (\text{Gl. 33})$$

Damit kann aus dem terminalen, linearen Teil des Plasmakonzentrationsverlaufs (Abb. 21) die Steigung der Geraden S_β und damit β (= die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante k_{e1}) erhalten werden:

$$\beta = -2,303 S_\beta \quad (G1. 34)$$

Dabei gilt:

$$\beta = \frac{k_{B,U} + k_{B,E_1}}{1 + k_{B,T}/k_{T,B}} = \frac{k_{B,E}}{1 + k_{B,T}/k_{T,B}} \quad (G1. 35)$$

Durch den Prozeß des Abschälens erhält man die gestrichelte Gerade in Abb. 21 und damit S_α . Hierzu werden die Logarithmen der Differenzen aus den experimentellen Werten b und den zu diesen Zeiten aus der Verlängerung der Eliminationsgeraden extrapolierten Werten b' aufgetragen und die erhaltenen Punkte zur Geraden S_α verbunden. Dies ergibt sich aus G1. 31 und 32:

$$b - b' = (ae^{-\alpha t} + b'_0 e^{-\beta t}) - b'_0 e^{-\beta t} = ae^{-\alpha t} \quad (G1. 36)$$

bzw. in logarithmischer Schreibweise:

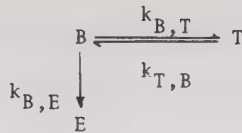
$$\log (b - b') = \log a - \alpha/2,303 \cdot t \quad (G1. 37)$$

wobei der neue Achsenabschnitt $\log a$ und die neue Steigung $S_\alpha = -\alpha/2,303$ bezeichnet.

$$\alpha = -2,303 \cdot S_\alpha \quad (G1. 38)$$

Die so ermittelten Hybrid-Geschwindigkeitskonstanten sind in Tab. 20 für die einzelnen Versuche angegeben.

Aus den Parametern α , β , a und b'_0 kann entsprechend Modell I



die Bestimmung der Mikro-Geschwindigkeitskonstanten erfolgen (42).

Hierbei gilt (42):

$$k_{T,B} = \frac{B'_\alpha + A\beta}{A + B'} = \frac{B'_\alpha + A\beta}{D_0} = \frac{b'_0\alpha + a\beta}{a + b'_0} = \frac{b'_0\alpha + a\beta}{b_0} \quad (G1.39)$$

$$k_{B,T} = \alpha + \beta - (k_{T,B} + k_{B,E}) \quad (G1.40)$$

$$k_{B,E} = \frac{D_0}{B'/\beta + A/\alpha} = \frac{b_0}{b'_0/\beta + a/\alpha} \quad (G1.41)$$

sowie

$$\alpha = \frac{1}{2} \left[k_{B,T} + k_{T,B} + k_{B,E} + \sqrt{(k_{B,T} + k_{T,B} + k_{B,E})^2 - 4 k_{T,B} k_{B,E}} \right] \quad (G1.42)$$

$$\beta = k_{el} = \frac{1}{2} \left[k_{B,T} + k_{T,B} + k_{B,E} - \sqrt{(k_{B,T} + k_{T,B} + k_{B,E})^2 - 4 k_{T,B} k_{B,E}} \right] \quad (G1.43)$$

Bei der peroralen Applikation ist ebenfalls unter bestimmten Voraussetzungen eine Ermittlung der Hybridgeschwindigkeitskonstanten durch "Abschälen" möglich. Für Modell Ia (siehe S. 62) gilt:

$$b = a'e^{-\alpha t} + b'_0e^{-\beta t} - c'e^{-k_{G,B}t} \quad (G1.44)$$

sowie:

$$c' = a' + b'_0 \quad (G1.45)$$

Dabei ist c' der Achsenabschnitt der abgeschälten Resorptionsgeraden zur Zeit $t = 0$, a' der Achsenabschnitt der abgeschälten Verteilungsgeraden zur Zeit $t = 0$ und b'_0 der Achsenabschnitt der extrapolierten Eliminationsgeraden bei $t = 0$ (siehe Abb.22).

Tab. 20 : Hybridgeschwindigkeitskonstanten für Verteilung und Elimination sowie Verteilungsvolumina V von Tridihexethylethyl- und decylsulfonat, berechnet aus den am Analogrechner ermittelten Mikrokonstanten

a) Geschwindigkeitskonstanten sowie Verteilungsvolumina V^+ von Tridihexethylethylsulfonat

Versuch	Hund	Appl.	$\alpha(\text{Std}^{-1})$	$\beta(\text{Std}^{-1})$	V (1)
2	II	i.v.	1,60	0,09	98,5
4	II	peros	1,21	0,08	"
6	II	i.v.	1,45	0,09	102,3
7	I	peros	1,36	0,09	91,5
9	I	i.v.	1,35	0,12	86,3
11	I	peros	1,23	0,13	"

⁺ Bei peroraler Applikation werden die Verteilungsvolumina V aus den vorangehenden i.v.-Daten zugrundegelegt.

b) Geschwindigkeitskonstanten sowie Verteilungsvolumina V^+ von Trihexethyldecylsulfonat

Versuch	Hund	Appl.	$\alpha(\text{Std}^{-1})$	$\beta(\text{Std}^{-1})$	V (1)
1	I	i.v.	1,53	0,08	88,2
3	I	peros	1,24	0,10	"
5	I	i.v.	1,40	0,10	91,5
8	II	peros	1,28	0,13	102,3
10	II	i.v.	1,30	0,10	107,0
12	II	peros	1,21	0,08	"

Wenn $k_{G,B}$ sowie α sehr viel größer als β sind, werden $e^{-\alpha t}$ und $e^{-k_{G,B}t}$ mit zunehmender Zeit t gegen 0 gehen, so daß wiederum für den terminalen Teil Gl. 33 gilt.

Damit kann β aus der Steigung S_β aus der Geraden der β -Phase und der Wert $\log b'_0$ aus dem extrapolierten Achsenabschnitt erhalten werden.

Durch Subtraktion der extrapolierten Werte b' von b erhält man

$$b - b' = a'e^{-\alpha t} - c'e^{-k_{G,B}t} \quad (\text{Gl. 46})$$

Wenn $k_{G,B} \gg \alpha$, wird der Teil der abgeschalteten Verteilungsgeraden (siehe Abb. 22) :

$$(b - b')_{\text{extrap}} = a'e^{-\alpha t} \quad (\text{Gl. 47})$$

⁺ Bei peroraler Applikation werden die Verteilungsvolumina V aus den vorangehenden i.v.-Daten zugrundegelegt.

bzw.

$$\log (b - b')_{\text{extrap}} = \log a' - \frac{\alpha}{2,303} t \quad (\text{Gl. 48})$$

Damit kann α aus der Steigung des linearen Teils der α -Phase und der Wert $\log a'$ aus dem extrapolierten Achsenabschnitt erhalten werden: Die Logarithmen der Differenzen der experimentellen Werte von b und den aus der Verlängerung der Geraden aus der Eliminationsphase zu diesen Zeiten extrapolierten Werte b' werden zur Geraden verbunden. Wie aus Tab. 20 hervorgeht, stimmen die so ermittelten Hybrid-Geschwindigkeitskonstanten nur ungefähr mit den zuvor aus den entsprechenden i.v.-Daten ermittelten Konstanten überein. Dies ist u.a. ein Hinweis darauf, daß α und $k_{G,B}$ nicht so stark differieren wie vorausgesetzt.

Außerdem gilt (42):

$$c'e^{-k_{G,B}t} = a'e^{-\alpha t} + b'_0e^{-\beta t} - b = (b - b')_{\text{extrap.}} + b' - b \quad (\text{Gl. 49})$$

woraus folgt, daß

$$\begin{aligned} \log c'e^{-k_{G,B}t} &= \log [(b - b')_{\text{extrap}} + b' - b] \quad (\text{Gl. 50}) \\ &= \log c' - \frac{k_{G,B}}{2,303} t \end{aligned}$$

Damit kann eine Schätzung für $k_{G,B}$ aus der Steigung $S_{G,B}$ der entsprechenden Geraden (siehe Abb. 22) und der Wert $\log c'$ aus dem extrapolierten Achsenabschnitt erhalten werden, indem die

Logarithmen der in Gl. 50 angegebenen Differenzen für die entsprechenden Zeiten zu einer Geraden verbunden werden (2.Abschälprozeß).

11.4 Ermittlung der Mikrokonstanten am Analogrechner

Die durch die graphische Auftragung ermittelten Mikrogeschwindigkeitskonstanten dienen als Anhaltspunkt für die Auswertung der Daten am Analogrechner (EAI, Achen, Typ Miniac). Entsprechend der Differentialgleichungen von Modell I und Ia findet die in Abb. 33 angegebene Schaltung zur Auswertung der Konzentrationsverläufe Anwendung. Hierbei ist das Modell I (i.v.) auf Modell Ia (peroral) umschaltbar. Die Zeittransformation wird in der Weise vorgenommen, daß ein Zeitskalenfaktor⁺ von $2,7778 \cdot 10^{-4}$ eingestellt wird. Dies hat zum Vorteil, daß die kinetischen Parameter in Std^{-1} direkt auf die Potentiometer übernommen bzw. abgegeben werden können.

Die Laufzeit des Programms wird dabei so eingestellt, daß 38 sec. bei einem Papier mit cm-Graduierung 38 cm entsprechen, d.h., damit skaliert 1 cm einen Zeitraum von 1 Stunde. Außerdem wird bei allen Modellen mit peroraler Applikation eine "Induktionszeit" von ca. 8 min. durch Verschiebung der Zeitachse eingesetzt⁺⁺.

⁺ Der Zeitskalenfaktor β gibt an, um welchen Faktor die Reaktion auf dem Rechner schneller bzw. langsamer abläuft als in Echtzeit.

⁺⁺ Der Einsatz einer Induktionszeit erweist sich als notwendig, um auch durch die experimentellen Werte der anfänglichen Resorptionsphase eine Anpassung des Kurvenverlaufs zu erreichen.

Für die Versuche 1 - 4 wird entsprechend Abb. 34 eine Variation der Schaltung vorgenommen, um eine Auftrennung von E in U und E_1 zu ermöglichen.

Für das "first pass" - Modell (IV) wird entsprechend Abb. 35 eine Variation der Schaltung vorgenommen, um dem zusätzlichen parallelen Weg zur Resorption des Arzneistoffs Rechnung zu tragen. Auf eine Aufspaltung von E in E_1 und U wird hierbei verzichtet.

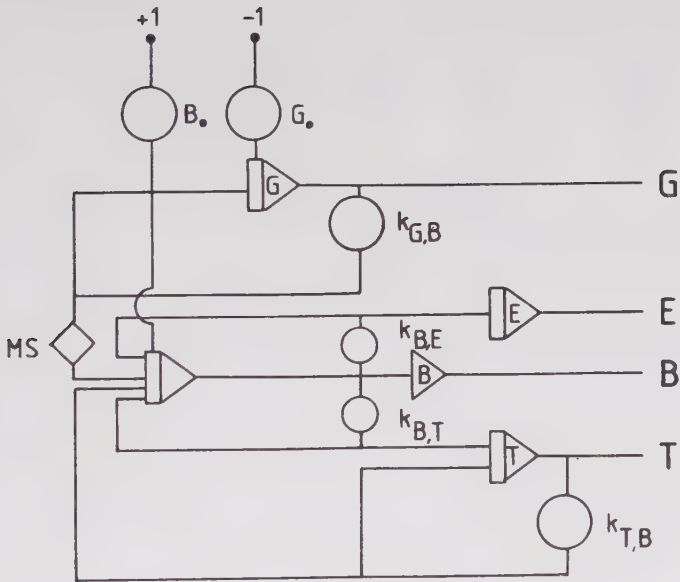


Abb. 33 : Analogrechnerschaltung für das Zweikompartmentmodell (für i.v. sowie perorale Applikation, umschaltbar durch den "manual switch" MS)

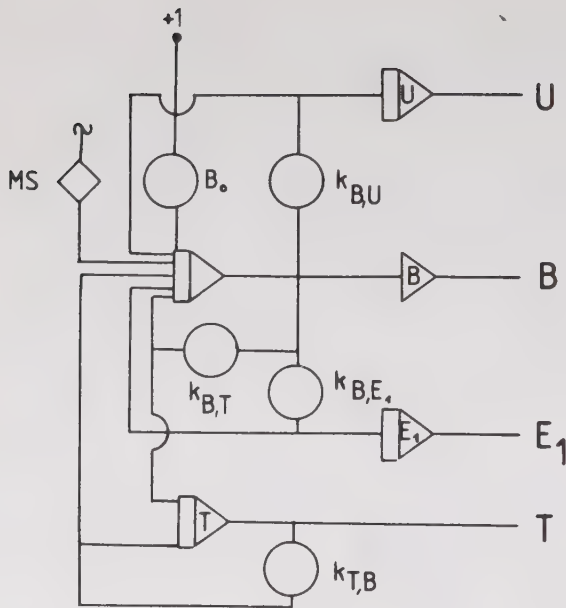


Abb. 34 : Analogrechnerschaltung für das Zweikompartmentmodell mit paralleler Ausscheidung

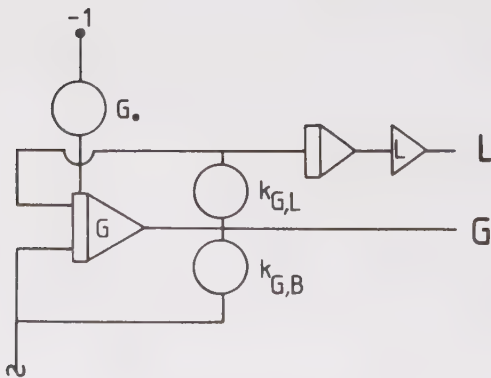


Abb. 35 : Analogrechnerschaltung für das Zweikompartmentmodell mit "first pass"-Effekt

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird das physikalisch-chemische Verhalten homologer quartärer Ammoniumverbindungen untersucht, wobei die Simulierung der gastro-intestinalen Resorption mit einem Membranmodell besondere Berücksichtigung findet. Als Modellsubstanzen finden neben homologen Benzilsäurecholinesterbromiden insbesondere homologe Salze des Tridihexethyls (Tridihexethyl-n-alkylsulfonate, -n-alkylsulfate sowie -carboxylate) Anwendung. Die dabei ermittelten Gesetzmäßigkeiten sind Grundlage einer Korrelation mit In-vivo-Ergebnissen zur Toxizität, zum pharmakokinetischen Verhalten sowie zur spasmolytischen Aktivität am Beispiel homologer Alkylsulfonate des Tridihexethyls. Hierbei können im einzelnen folgende Gesetzmäßigkeiten zu physikalisch-chemischen Eigenschaften, zur Membrandiffusion und zur Resorption abgeleitet werden:

1. Homologe Tridihexethylsalze zeigen mit Zunahme der Kettenlänge der Gegenionen einerseits Abnahme der Schmelzpunkte und der Löslichkeit in Wasser sowie andererseits Zunahme der Löslichkeit in n-Octanol, der n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten und der Oberflächenaktivität, ohne daß Mizellbildung nachweisbar ist.
2. Tridihexethyl-n-alkylsulfonate und -n-alkylsulfate dissoziieren in Wasser stark, während sie in organischer Phase (n-Octanol) größtenteils zu Ionenpaaren assoziiert vorliegen. Mit steigender Kettenlänge der Gegenionen verringert sich die Ionenpaardissoziation in Wasser, wobei die pK -Werte den Taft'schen Substituentenkonstanten proportional sind. Damit

ähneln die genannten Salze in ihrem Ionenpaardissoziationsverhalten den homologen Benzilsäurecholinesterbromiden.

3. Bei der Diffusion durch lipophile Membranen (n-Octanol + Stüttschicht) erfolgt der Übertritt der quartären Verbindungen in Form von Ionenpaaren. Die Geschwindigkeit der Membranpassage kann über die Erhöhung des n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten entweder durch Kettenverlängerung am Arzneistoffkation (homologe Benzilsäurecholinesterbromide) oder durch Einsatz lipophiler Gegenionen (homologe Salze des Tridihexethyls) gesteigert werden, allerdings nur bis zu einem Grenzwert. Diese Befunde lassen sich mit den Vorstellungen wässriger, adhärrierender Schichten an der Lipidmembran deuten: Bei Übertritt hydrophiler Verbindungen ist die Diffusion durch die organische Schicht (n-Octanol) geschwindigkeitsbestimmend und damit abhängig vom Verteilungskoeffizienten der Substanzen zwischen Membran und wässrigem Kompartiment. Bei lipophilen Salzen dagegen werden die wässrigen, adhärrierenden Schichten geschwindigkeitsbestimmend für die Diffusion, die damit nicht mehr verteilungskontrolliert ist.
4. Unterschiede in den Diffusionskoeffizienten sind für den Membrantransport innerhalb einer homologen Reihe von Salzen von untergeordneter Bedeutung, sie müssen aber beim Vergleich mit anderen Salzen neben den Verteilungskoeffizienten berücksichtigt werden.
5. In ähnlicher Weise wie sich die Gegenionen quartärer Ammoniumverbindungen auf das Diffusionsverhalten in vitro

auswirken, werden auch Diffusionsprozesse in vivo (gastrointestinale Resorption, transperitoneale Diffusion) durch die pharmazeutisch-technologische Maßnahme unterschiedlicher Salzbildung beeinflußt. Die direkte pharmakodynamische Aktivität am isolierten Organ (Jejunum der Ratte) erfährt dagegen durch Variation der Gegenionen keine Veränderung.

6. Untersuchungen an der Maus zeigen, daß die Toxizität homologer Alkylsulfonatsalze des Tridihexethyls nach intra-peritonealer Injektion und damit die transperitoneale Diffusion mit zunehmender Alkylkettenlänge der Gegenionen zunimmt. Dabei zeigen sowohl die mittlere letale Dosis (LD_{50}) als auch die Zeit bis zum Eintritt der Letalität (LT) die Tendenz, bei großer Lipophilie der Salze vom Verteilungskoeffizienten unabhängig zu werden.

7. Homologe Salze mit stark unterschiedlichem Verteilungskoeffizienten (Tridihexethylethyl- und -decylsulfonat) werden nach peroraler Gabe sowohl von der Maus als auch vom Hund rasch resorbiert. Dabei ergeben sich folgende Unterschiede bei den Homologen:

Die Maus resorbiert das lipophilere Salz in größerem Umfang als das hydrophilere, wie Unterschiede in renaler Ausscheidung bzw. Ausscheidung mit den Faeces ausweisen. Auch beim Hund deutet die Simulierung zweier verschiedener pharmakokinetischer Modelle (Arzneistoffbindung im Gastro-Intestinaltrakt und "first pass" - Effekt) darauf hin, daß das Tridihexethyldecylsulfonat den Gastro-Intestinaltrakt schneller

und in größerem Umfang als das Ethylsulfonat verläßt.
Damit ergeben sich enge Beziehungen zwischen dem In-vitro-
und In-vivo-Verhalten von quartären Ammoniumverbindungen
mit unterschiedlich lipophilen Gegenionen.

VII. LITERATUR

- (1) Alban, L. Sundwall, A., Vangbo, B., Act.pharm.tox.
27, 97 (1969).
- (2) Anderson, F.S., Murphy, R.C., J.Chromatograph.
121, 251 (1976).
- (3) Back, D.J., Calvey, T.N., Br.J.Pharmac. 44, 534 (1972).
- (4) Barnes, T.C., Frances, S., Arch.Int.Pharmacody.
160, 83 (1966).
- (5) Becker, B.A., Swift, J.G. Toxicol.Appl.Pharmacol.
1, 42 (1959).
- (6) Bliss, C.I., "Statistics in Biology", Vol. I,
McGraw-Hill, New York, S. 100 (1967).
- (7) Boen, S.T., Medicine, 40, 243 (1961).
- (8) Brdicka, R., "Grundlagen der physikalischen Chemie"
VEB Verlag der Wissenschaften, Berlin 1965, S. 595.
- (9) Breusch, F.L., Fortschr.Chem.Forsch. 12, 119 (1969).
- (10) Brise, H., Hallberg, L., Acta med.Scand. 171, 47 (1962).
- (11) Brodie, B.B., Hogben, C.A.M., J.Pharm.Pharmacol.
9, 345 (1957).
- (12) Büchi, J. Perlia, X., "Beziehungen zwischen den phys.
chem. Eigenschaften und der Wirkung von Lokalanästhetika",
Editio Cantor, Aulendorf 1962.
- (13) Cavalli-Sforza, L., "Grundzüge biologisch-medizinischer
Statistik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1974).
- (14) Cavallito, C.J., O'Dell, T.B., J.Pharm.Ass. 47, 169 (1958).
- (15) Chang, S.Y., Alberts, D.S., Melnik, C.R., Walson, P.D.,
J.Pharm.Sci. 67, 679 (1978).

- (16) Chatten, L.G., Okamura, K.O. J.Pharm.Sci.
62, 1328 (1973).
- (17) Crank, J., "The Mathematics of Diffusion", Oxford &
University Press, London (1967).
- (18) Davis, S.S., Higuchi, T., Rytting, J.H., J.Pharm.
Pharmakol. 24, 30 (1972).
- (19) Dittert, L.W., Adams, H.J., Alexander, F., Chong,
C.W., Ellison, T., Swintosky, J.V., J.Pharm.Sci.
57, 1146 (1968).
- (20) Dost, F.H., "Grundlagen der Pharmakokinetik", Thieme
Verlag, Stuttgart (1968).
- (21) Eichler, Handbook of exp. Pharmakol., S. 407
Springer Verlag, Heidelberg (1971).
- (22) Engelhard, H., Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Springer Verlag, Heidelberg (1975).
- (23) Engelhardt, A., Wick, H., Arzneim.forsch. 10, 763 (1960).
- (24) Evans, D.F., Gardam, P., J.physic.Chem. 72, 3281 (1968).
- (25) Evans, D.F., Nadas, J.A., Matesich, M.A., ibid. 75,
1708 (1971).
- (26) Fed.Reg. 42, 1648 (1977).
- (27) Feldman, S.A., Cohen, E.N., Golling, R.C.,
Anaesthesiol. 30, 593 (1969).
- (28) Feldman, S., Richardson, J., Freeman, S., Pollock, S.,
Berger, J., Kaplan, F., Rhoa, G., J.Pharm.Sci.
63, 454 (1974).
- (29) Fick, A., Ann.phys.chem. 94, 59 (1855).
- (30) Fiese, G., Perrin, H.J., J.Pharm.Sci. 58, 599 (1969).

- (31) Finney, D.J., "Statistical Method in Biological Assay", Publ.Chas.Griffin et Co. Ltd., (1964).
- (32) Flynn, G.L., J.Pharm.Sci. 60, 345 (1971).
- (33) Flynn, G.L., Roseman, T.J., ibid. 60, 1788 (1971).
- (34) Flynn, G.L., Yalkowsky, S.H., ibid. 61, 838 (1972).
- (35) Flynn, G.L., Yalkowsky, S.H., Roseman, T.J., ibid. 63, 479 (1974).
- (36) Frost, A.A., Pearson, R.G., "Kinetik und Mechanismus homogener chemischer Reaktionen", Verlag Chemie, Weinheim (1964).
- (37) Friedman, H., Wang, R., J.Pharm.Sci. 61, 1663 (1972).
- (38) Fung, H.L., Ow, Y.H., J.Pharm.Sci. 61, 1967 (1972).
- (39) Gaginella, T.S., Perrin, J.H., Vallner, J.J., Bass, P., J.Pharm.Sci. 63, 790 (1974).
- (40) Gaginella, T.S., Bass, P., Perrin, J.H., Vallner, J.J., J.Pharm.Pharmac. 25, 271 (1973).
- (41) Garrett, E.R., in H.P. Kummerle, E.R. Garrett, K.H. Spitzzy "Klinische Pharmakologie und Pharmakotherapie", Urban und Schwarzenbeck, München 1973, S. 49 ff.
- (42) Garrett, E.R., in "Workshop on Basic Pharmacokinetics and Biopharmaceutics", Hahnenklee, 1977.
- (43) Garrett, E.R., Chemburkar, P.B., J.Pharm.Sci. 57, 949 (1968).
- (44) Gibaldi, M., Grundhofer, B., J.Pharm.Sci. 62, 343 (1973).
- (45) Hansch, C., Clayton, J.M., J.Pharm.Sci. 62, 1 (1973).
- (46) Hansch, C., Dunn, W.J., ibid. 61, 1 (1972).
- (47) Hansch, C., Fujita, T., J.Amer.chem.Soc. 86, 1616 (1964).
- (47a) Helfferich, F. Disc.Farad.Soc. 21, 83 (1956).
- (48) Higuchi, T., "Thermodynamics, Kinetics and Mechanisms of interface Transport of organic Ammonium Species", Upjohn Seminar, in Wagner, J.G., Drug.Intelligence 2, 181 (1968).

- (49) Hogben, C.A.M., Tocco, D.J., Brodie, B.B.,
Schanker , L.S., J.Pharmacol.exp.Ther. 125, 275 (1959).
- (50) Hom, F.S., Ebert, W.R., J.Pharm.Sci. 66, 711 (1977).
- (51) Howard, S.A., Farvar, M.A., Suzuki, A., Higuchi, W.I.,
J.Pharm.Sci. 58, 1325 (1969), *ibid.* 58, 1330 (1969).
- (52) Irwin, G.M., Kostenbauder, H.B., Dittert, L.W.,
Staples, R., Misher, A., Swintosky, J.V., J.Pharm.Sci.
58, 313 (1969).
- (53) Iwasa, J., Fujita, T., Hansch, C., J.med.Chem. 8,
150 (1965).
- (54) Jost, W., "Diffusion in Solids, Liquids, Gases",
Academic Press, New York (1952).
- (55) Kakemi, K., Sezaki, H. Muranishi, S., Tsujimura, Y.,
Chem.Pharm.Bull, 17, 1641 (1969).
- (56) Kates, R.E., McKennon, D.W., Comstock, T.J.,
J.Pharm.Sci. 67, 269 (1978).
- (57) Kay, R.L., Zawoyski, C., Evans, D.F., J.physic.Chem.
69, 4208 (1965).
- (58) Kratochvil, B., Yeager, H.L., Fortschr.chem.Forsch.
27, 1 (1972).
- (59) Leeson, L.J., Weintraub, H., J.Pharm.Sci. 62, 1936 (1973).
- (59a) Lemanowicz, E.F., Sugita, E.T., Niebergall, P.J.,
Schnaare, R.L., J.Pharm.Sci., 68, 141 (1979).
- (60) Leo, A., Hansch, C., Elkins, D., Chem.Rev. 71, 525 (1971).
- (61) Levine, R.R., J.Pharmac.exp.Ther. 129, 296 (1960).
- (62) Levine, R.R., Blair, M.R., Clark, B.B., *ibid.* 114,
78 (1955).
- (63) Levine, R.R., Clark, B.B., *ibid.* 114, 63 (1955),
ibid. 121, 63 (1957).

- (64) Levine, R.M., Clark, B.B., Arch.int.Pharmacodyn.
112, 458 (1957).
- (65) Levine, R.R., Pelikan, E.W., J.Pharmac.exp.Ther.
131, 319 (1961).
- (66) Levine, R.R., Steinberg, G.M., Nature, 209, 269 (1966).
- (67) Lien, E.J., Drug Intell.Clin.Pharm. 4, 7 (1970).
- (68) Levy, G., Matsuzawa, T., J.Pharm.Sci. 54, 1003 (1965).
- (68a) Lippold, B.C., "Einführung in die Biopharmazie",
Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 1974.
- (69) Lippold, B.C., Pharmazie, 28, 713 (1973).
- (70) Lippold, B.C., Adel, M.S., Arch.Pharmaz. 305, 417 (1972).
- (71) Lippold, B.C., Biedermann, I., Pharmazie, 29, 393 (1974).
- (72) Lippold, B.,C., Schneider, G.F., Arneim.Forsch. 24,
1952 (1974).
- (73) Lippold, B.C., Schneider, G.F., ibid. 25, 843 (1975).
- (74) Lippold, B.C., Schneider, G.F., ibid. 25, 1683 (1975).
- (75) Lippold, B.C., Schneider, G.F., ibid. 26, 2202 (1976).
- (76) Lippold, B.C., Schneider, G.F., Pharmazie, 31, 237 (1976).
- (77) Lippold, B.C., Schneider, G.F., Arch.Pharmaz. 307,
63 (1974).
- (78) Lippold, B.H., Ullmann, E., Sgoll, G.B., Pharm.Ind.
37, 1057 (1975).
- (79) Lippold, B.H., Pharm.Ind. 38, 208 (1976).
- (80) Loo, J.C.K., Riegelman, S., J.Pharm.Sci. 57, 918 (1968)
- (81) Lüthi, U., Waser, P.G., Archs.int.Pharmacodyn.Ther.
156, 319 (1965).
- (82) Masaki, B.W., Lien, E.J., Biles, J.A., Acta Pharm.
Suec. 10, 43 (1973).

- (83) Meijer, D.K.F., Weitering, J.G., Eur.J.Pharmac.
10, 283 (1970).
- (84) Meshi, T., Tamaki, H., Chem.Pharm.Bull, 26, 379 (1973).
- (85) Modin, R., Schill, G., Acta Pharm.Suec. 7, 585 (1970).
- (86) Morozowich, W., Chulski, T., Hamlin, E.W., Jones, P.M.,
Northam, J.I., Purmalis, A., Wagner, J.G., J.Pharm.Sci.
51, 993 (1962).
- (87) Mukerjee, P., Mysels, K.J., "Critical Micelle Concentra-
tion of Aqueous Surfactant Systems", Superint. of
Documents, US Government Print. Off., Washington 1971.
- (88) Mukerjee, P., Advan.Colloid Interface Sci. 1, 241 (1967).
- (89) Nakamura, J., Muranishi, N., Kimura, T., Muranishi, S.,
Sezaki, H., Chem.Pharm.Bull. 25, 851 (1977).
- (90) Niebergall, P.J., Patil, M.Y., Sugita, E.T., J.Pharm.
Sci. 56, 943 (1967).
- (91) Notari, R.E., DeYoung, J.L., Reuning, R.H., J.Pharm.Sci.
61, 135 (1972).
- (92) Osterberg, A.C., Gray, W.D., Arch.Int.Pharmacodyn.
137, 250 (1962).
- (93) Penniston, J.T., Beckett, L. Bentley, D.L., Hansch, C.,
Mol.Pharmacol. 5, 333 (1969).
- (94) Pentikäinen, P., Penttilä, A., Vapaatalo, H., Hackmann,
R., J.Pharm.Pharmac. 25, 371 (1973).
- (95) Perrier, D., Gibaldi, M., J.Pharm.Sci. 62, 225 (1973).
- (96) Perrin, J.H., Vallner, J.J., J.Pharm.Pharmacol.
22, 758 (1970).
- (97) Persson, B.A., Karger, B.L., J.Chromatogr.Sci.
12, 521 (1974).

- (98) Peterson, M.A., Gregor, H.P., J.Elektrochem.Soc.
106, 1051 (1959).
- (99) Plakogiannis, F.M., Lien, E.J., Harris, C., Biles,
J.A., J.Pharm.Sci. 59, 197 (1970).
- (100) Randolph, W.C., Osborne, V.L., Wallenstein, S.S.,
Intoccina, A.P., J.Pharm.Sci. 66, 1149 (1977).
- (101) Riegelman, S., Rowland, M., J.Pharmakokin. and
Biopharm. 1, 419 (1973).
- (102) Rosano, H.L., Duby, P., Schulman, J.H., J.Phys.Chem.
65, 1704 (1961).
- (103) Saxena, S.J., Stewart, J.T., Honigberg, J.L.,
Washington, J.G., Keene, G.R., J.Pharm.Sci. 66,
813 (1977).
- (104) Schanker, L.S., J.med.pharm.Chem. 2, 343 (1960).
- (105) Schanker, L.S., Shore, P.A., Brodie, B.B., Hogben,
C.A.M., ibid. 120, 528 (1957).
- (106) Schanker, L.S., Solomon, H.M., Am.J.Physiol.
204, 829 (1963).
- (107) Schneider, G., Dissertation, München, 1974.
- (108) Scott, J.E., Biochem.biophys.Acta, 18, 428 (1955).
- (109) Shama, J.P., Koritz, G.D., Perkim, E.G., Bevill, R.F.,
J.Pharm.Sci., 66, 1319 (1977).
- (110) Shaw, D.J., "Introduction in Colloid and Surface
Chemistry", Butterworth, London, 1966.
- (111) Sidell, F.R., Groff, W.A., Kaminskis, A., J.Pharm.Sci.
61, 1136 (1972).
- (112) Skog, E., Acta Pharm.Tox. 6, 299 (1950).

- (113) Smolen, V.F., J.Pharm.Sci., 60, 355 (1971).
- (114) Sollner, K., "The Basic Elektrochemistry of Liquid Membranes", in Sherwood, J.N., Chadwick, A.V., "Diffusion Processes", Gordon and Beach Science Publishers, London, 1971.
- (114a) Sommer, F., Dissertation, München 1971.
- (115) Stehle, R.G., Higuchi, W.I., J.Pharm.Sci. 61, 1922 (1972),
ibid. 61, 1931 (1972), ibid. 56, 1367 (1967).
- (116) Stransky, D.E., Dissertation, München, 1976.
- (117) Stricker, H., Pharm.Ind. 33, 157 (1971).
- (118) Stricker, H., Arzneim.Forschm. 20, 391 (1970).
- (119) Sturtevant, F.M., Pauls, J.F., Abr.Toxicol.appl. Pharmacol. 3, 80 (1961).
- (120) Sundwall, A., Uthne, K., Vessman, J., Acta Pharm.Tox. 29, 385 (1972).
- (121) Suzuki, A., Higuchi, W.I., Ho, N.F.H., J.Pharm.Sci. 59, 644 (1970).
- (122) Suzuki, E., Tsuikigi, M., Muranishi, S., Sezaki, H., Kakemi, K., J.Pharm.Pharmakol. 24, 138 (1972).
- (123) Taft, R.W., J.Amer.chem.Soc. 74, 2729 (1952), ibid. 75, 4231 (1953), ibid. 76, 305 (1954).
- (124) Thover, G., Compt.rend.hebd.Séances Acad.Sci. 135, 579 (1902), ibid. 150, 270 (1910).
- (125) Van Rossum, J.M., Van den Brink, Arch.int.Pharmakodyn. 143, 240 (1963).
- (126) v.Puglisi, C., de Silva, J.A.F., J.Chromatogr. 120, 457 (1976).

- (127) Walkling, W.D., Bonfilio, A.C., Jakoby, H.I.,
J.Pharm.Sci. 67, 945 (1978);
Walkling, W.D., Holmes, D.G., Cressman, W.A.,
Dix, R.K., Piperno, E., Mosher, A.H., *ibid.* 67,948 (1978).
- (128) Wells, P.R., Chem.Reviews 62, 172 (1962).
- (129) Yalkowsky, S.H., Flynn, G.L., J.Pharm.Sci. 62,210 (1973).
- (130) Yalkowsky, S.H., Flynn, G.L., Slunik, T.G., *ibid.*
61, 852, (1972).
- (131) Yalkowsky, S.H., Slunik, T.G., Flynn, G.L., *ibid.*
63, 691 (1974).
- (132) Yeh, K.C., Higuchi, W.I., *ibid.* 61, 1648 (1972).

LEBENS LAUF

Wolfgang Adolf Lettenbauer geboren am 28.4.1948 in Nördlingen als Sohn des Bürgermeisters Adolf Lettenbauer und seiner Ehefrau Helma, geb. Wolf. Seit 1976 verheiratet mit Gisela Lettenbauer, geb. Kautzner; 1 Kind.

Schulbildung: 1954 - 1959 Volksschule Schwabmünchen; 1960 - 1963 Holbein-Gymnasium, Augsburg; 1963 - 1969 Jakob-Fugger-Gymnasium, Augsburg

Reifeprüfung: 28.6.1969 in Augsburg

Berufsausbildung:

Praktikantenzeit: 1969 - 1971 Pankratius-Apotheke, Augsburg, Apotheker H. Schwab

Pharmazeutisches Vorexamen: 28.6.1971 in Augsburg

Studium der Pharmazie: WS 1971 - WS 1974, Universität Münster

Pharmazeutische Prüfung

Erster Abschnitt: 12.10.1973

Zweiter Abschnitt: 7.4.1975

Approbation als Apotheker: 24.6.1975

Wissenschaftliche Arbeit: Juli 1975 - März 1979 unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.B.C. Lippold am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München sowie am Institut für Pharm.Technologie der Universität Düsseldorf. Seit 1.6.77 Vervalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle.

FOTODRUCK J. MAINZ — Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen